

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

LES RÔLES DES ISOFORMES D'AKT DANS LES PROCESSUS
REPRODUCTIFS CHEZ LA SOURIS

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
LAURENCE TARDIF

AVRIL 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

À *ma* famille, pour tout.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Éric Asselin, pour m'avoir accueillie dans son équipe ainsi que de m'avoir accordé sa confiance pour mes travaux de recherches. Merci aussi à ma codirectrice, Monique Cadrin pour son soutien.

Merci à Céline Van Themsche, pour sa patience face à mes mille et une questions lors de mon parcours scolaire. Son attention envers ces étudiants et sa bienveillance sont un vrai cadeau.

Merci à François Fabi, qui a été un vrai mentor tout au long de mon parcours dans le laboratoire. Ces connaissances m'ont été d'un immense aide que ce soit lors de l'approche expérimentale, des analyses et de la rédaction.

Merci également à Pascal Adam pour son écoute attentive à tous mes questions et commentaires lors de ces deux années d'étude. Ton aide a été très utile.

Un merci aussi à toute l'équipe du laboratoire, car chacun d'entre vous a su trouver un peu de temps pour m'aider dans mon projet. Votre aide a été précieuse. Ce fut un plaisir de faire partie de l'équipe. Merci également à Sophie Parent, assistante de recherches, qui m'a dirigée dès mes premiers jours au laboratoire.

Merci aux techniciens de l'animalerie, soient Christel Perron, Nadia Desnoyers, Sonia Gauthier et Michel Demers pour leurs très bons soins envers les souris utilisées lors de cette étude.

Merci à mes ami(e)s, qui ont su écouter mes états d'âme à plusieurs reprises lors de nos dîners et soirées. Merci pour les merveilleuses discussions et le plaisir.

Un dernier merci, tout spécial, à ma famille, mon père, ma mère et ma sœur, pour leur encouragement du premier jour d'école à la maternelle au dernier jour de ma maîtrise, matin et soir, sept jours sur sept. Votre soutien inestimable, votre écoute et votre foi en moi m'ont permis de persévérer jusqu'à la fin. Je vous serai éternellement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait, ce que vous avez sacrifié pour moi, pour ma réussite. Je vous remercie du fond du cœur et je vous aime.

RÉSUMÉ

Au Canada, l'infertilité féminine a doublé depuis les années 1980 et à ce jour, 16 % des couples canadiens ont de la difficulté à procréer. Pour qu'une gestation soit réussie, il doit avoir une communication adéquate entre le fœtus et les tissus utérins maternels. La protéine kinase Akt (*activated by kinase tyrosine*), existant en trois isoformes (1,2,3), est impliquée à divers moments pendant le cycle œstral et lors de l'implantation embryonnaire, car elle permet la survie cellulaire et l'apoptose dans le tissu utérin.

Les rôles spécifiques des isoformes dans les processus reproductifs n'ont pas encore été décrits dans la littérature scientifique. Cette recherche compte identifier la fonction spécifique de chaque isoforme d'Akt dans l'utérus à différents stades du cycle reproductif murin. L'hypothèse de recherche est qu'un problème de régulation de ces isoformes pourrait être la cause d'infertilité ou d'autres pathologies utérines. En utilisant le système PGR-Cre-LoxP, les souris C57BL/6 sont KO pour les isoformes d'Akt (toutes les recombinaisons) dans les organes sexuels.

Les analyses Western Blot d'endomètre utérin de souris *Wild-type* (WT) ont confirmé qu'Akt1, 2 et 3 varient dans le cycle œstral. Les analyses des portées de souris ont démontré que l'absence d'une ou plusieurs isoformes d'Akt diminue la fertilité chez les souris femelles. Les analyses de coloration hématoxyline et éosine ont démontré que les isoformes d'Akt n'avaient pas d'effet sur l'épaisseur du stroma utérin. Le *knock-out* (KO) Akt1-2 permet une diminution significative du nombre de glandes endométriales dans toutes les phases du cycle et le KO Akt2-3 permet une augmentation des glandes en œstrus. La taille des glandes endométriales ne varie pas pour les phases œstrus, metestrus, diestrus. Cependant, le KO Akt1-2 permet la diminution de leur taille en proestrus. Certaines protéines en aval d'Akt ont été analysées par immunohistochimie telles que c-jun, FoxO1, cleaved-caspase 3 et 7, cleaved-PARP, PCNA ainsi que le récepteur à l'œstrogène α (ER α) et récepteur à la progestérone (PGR). Les résultats démontrent que cl-PARP est absent dans le stroma pour toutes les phases du cycle. Les autres cibles varient selon la phase du cycle, du KO ainsi que de leur localisation cellulaire (épithélium luminal, glandulaire et le stroma utérin). En effet, dans les glandes endométriales, Akt1-2 amène une augmentation ER α en metestrus ainsi qu'une augmentation de PCNA, PGR et une diminution de cl-Casp7 en œstrus. Une augmentation de c-jun, PGR et une diminution de cl-Casp3 sont observés en proestrus. Une diminution de cl-Casp3 est décelable en diestrus. Akt2-3 mène à une diminution de c-jun, mTOR et ER α en œstrus. Ces résultats suggèrent que les isoformes d'Akt, particulièrement Akt1 et Akt2, sont des molécules essentielles pour la régulation du cycle œstral et les changements cycliques de l'endomètre.

Cette recherche a permis une meilleure compréhension des isoformes d'Akt dans la reproduction féminine. Des études futures pourront approfondir le rôle de ces isoformes lors de la décidualisation, de l'implantation et de la parturition ainsi que sur l'endométriose. Des biopsies utérines de femmes infertiles pourront être analysées pour confirmer un dérèglement des isoformes d'Akt.

Mots-clés : Akt, utérus, fertilité, signalisation cellulaire, souris transgéniques.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'infertilité féminine	1
1.2 Reproduction chez la femme	3
1.3 Anatomie du tractus génital femelle chez la souris	10
1.4 Cycle ovarien chez la souris femelle	11
1.4.1 Les phases du cycle œstral.....	12
1.4.2 Différenciation des phases par un frottis vaginal.....	14
1.5 Voie de signalisation PI3K/Akt.....	15
1.5.1 Signalisation cellulaire de la voie PI3K/Akt.....	16
1.5.2 Activation d'Akt	16
1.5.3 Isoformes d'Akt	18
1.5.4 Akt dans la reproduction.....	21
1.6 Apoptose.....	21
1.6.1 Caspases.....	22
1.6.2 Voie de signalisation des caspases.....	23
1.6.3 Famille BCL-2	24
1.6.4 PARP	26
1.6.5 FoxO1	27
1.7 Prolifération cellulaire	29
1.7.1 C-jun	29
1.7.2 MTor	30
1.7.3 PCNA.....	32
1.8 Modèle animal	32
1.9 Hypothèse/Objectif.....	36

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE	38
2.1 Contribution des auteurs	38
2.2 Résumé de l'article	38
2.3 Article complet (anglais) : Effect of Akt1, Akt2 and Akt3 specific endometrial deletion and their combinations in the mouse uterus.....	40
Abstract.....	40
Introduction.....	41
Material and Methods	43
Animals and tissues	43
Histological analyses.....	44
Immunohistochemistry.....	44
Immunofluorescence	45
Western Blot analysis.....	45
Statistical analysis	46
Results	46
Validation of the knockout mice models.....	46
Akt is important for female fertility	48
Akt does not influence the size of the uterine stroma	49
Akt plays a role on endometrial glands development	51
Downstream target of Akt	53
Discussion.....	56
Conclusion	58
Declaration of interest.....	59
Funding	59
Acknowledgment.....	59
References.....	59

CHAPITRE III

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	64
3.1 Discussion.....	64
3.2 Conclusions	76
3.3 Perspectives	77
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	79

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Organe reproducteur de la femme.....	4
1.2	Cycle reproducteur chez la femme	8
1.3	Activation hormonale du travail lors de l'accouchement	10
1.4	Système reproducteur de la souris	11
1.5	Similarité et différences entre le cycle menstruel féminin et le cycle œstral de la souris	12
1.6	Cycle hormonal chez la souris	13
1.7	Utérus et coupes utérines de la souris	14
1.8	Frottis vaginal d'une souris.....	15
1.9	Voie de signalisation simplifiée d'Akt	18
1.10	Structure des isoformes d'Akt	21
1.11	Cascade d'activation des caspases	23
1.12	Voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose dans une cellule	24
1.13	Voie de signalisation simplifiée de l'apoptose	26
1.14	Voie de signalisation de FoxO1	28
1.15	Voie de signalisation JNK	30
1.16	Fonctions de mTOR.....	31
1.17	Voie de signalisation de mTOR.....	32
1.18	Nos souris transgéniques Cre-LoxP ou KO	33
1.19	Système Cre-LoxP	35
1.20	Analyse des coupes utérines murines	37

3.1	Comparaison des isoformes d'Akt dans le cycle œstrus chez la souris WT..	67
3.2	Analyses utérines des souris PUGKO.....	69
3.3	Autres cibles intéressantes pour des analyses d'IHC.....	72
3.4	Voie de signalisation de LIF	74
3.5	Expression des isoformes d'Akt dans l'épithélium glandulaire dans l'utérus des souris transgéniques.....	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Akt	Activated by kinase tyrosine
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
AP-1	Activator protein 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ankrd2	Ankyrin repeat domain 2
ARN	Acide ribonucléique (interferent, message et micro)
Bad	BCL-2 associated agonist of cell death
Bax	BCL-2 associated X
Bid	BH3 interactiong-domain death agonist
BCL-xL	BCL-2 like 1
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BRCA	Breast cancer gene
Caspase	Cysteine-containing aspartate specific proteases
Cl	Cleaved
ER	Estrogen receptor (α and β)
ERK 1 / 2	Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
EGF	Epithelial growth factor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fas	TNF superfamily receptor 6
Fas-L	Fas ligand
Fas-R	Fas receptor

FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FoxO1	Forkhead box protein O1
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GAB1	Growth factor receptor-bound protein 2 associated binding protein 1
GnRH	Guanine nucleotide exchange hormone
GLUT	Glucose transporter
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
hCG	Human chorionic gonadotropin
H&E	Hématoxyline et éosine
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
I κ B	Inositol κ B
IL15	Interleukine 15
IF	Immunofluorescence
Jak/STAT	Janus kinase/signal transduced and activators of transcription
JNK	Jun N-terminal kinase
IHC	Immunohistochimie
KO	Knock-out
LH	Hormone lutéinisante
LIF	Leukemia inhibitory factor
LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
mTor (C1 ou 2)	Mammalian target of rapamycin complex 1 ou 2
NF κ B	Nuclear Factor κ B
pAkt	PhosphoAkt

PARP	Poly-ADP-ribose polymerases
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDK	Phosphoinositide-dependent kinase
PGR	Progesterone receptor (A and B)
PHLPP	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinases
PIP2	Phosphatidylinositol 2-Phosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 2-3-Phosphate
PKB	Protéine kinase B
PMA	Procréation médicalement assistée
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PUGKO	Progesterone-induced uterine gland knockout
P53	Tumor protein 53
RT-qPCR	Real Time quantitative polymerase chain reaction
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase 1
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TNFR1	Tumor necrosis factor α receptor I
TNFR2	Tumor necrosis factor α receptor II
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Wnt	Wingless
WT	Wild type
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 L'infertilité féminine

L'infertilité représente un réel problème de santé dont l'incidence est en constante augmentation, dans les dernières décennies (1). Selon Santé Canada, les taux d'infertilité ont doublé depuis les années 1980 (2). L'infertilité est définie lors de l'absence de conception à la suite de rapports sexuels sans moyen de contraception pendant un an pour les femmes de moins de 35 ans et 6 mois pour les plus de 35 ans (3). En effet, il a été démontré que la fertilité féminine diminue après l'âge de 35 ans (4).

Il y a plusieurs facteurs qui peuvent mener à l'infertilité féminine, soit environ 35 % des cas d'infertilité (5). Les facteurs génétiques peuvent favoriser certains problèmes utérins comme l'endométriose (35 à 50% des problèmes d'endométriose conduiront à un diagnostic d'infertilité) et les fibromes utérins (6). Puis, il y a les facteurs modifiables tels que l'obésité et la consommation de cigarettes qui sont associés à une diminution de la réserve ovarienne et à la diminution de la qualité des embryons (7). La qualité embryonnaire permet de catégoriser l'embryon selon plusieurs facteurs, dont une fécondation normale (avec l'analyse des pronucléi et des globules polaires), de la qualité de la première division cellulaire (deux cellules de taille similaire, non multinucléées), et la qualité du blastocyste en analysant les cellules (euploïdes ou aneuploïdes) du bouton embryonnaire et du trophoctoderme (8). Des facteurs endocriniens qui peuvent causer des déséquilibres hormonaux. Ceux-ci causent une dysfonction au niveau de l'ovulation affectant ainsi le cycle ovarien de la femme (9). Finalement, une obstruction des trompes de Fallope peut aussi causer des problèmes de fertilité. En plus des facteurs physiques, il y a les problèmes psychologiques et sociaux qui peuvent mener à l'infertilité. Pour le niveau social, la qualité des soins et le stress sont toutes des variables pouvant mener à l'impossibilité de procréer chez les femmes (4, 10, 11). L'âge avancé des femmes lors de

la conception est souvent remis en cause, compte tenu du délai croissant découlant de longues études et l'intérêt de poursuivre une carrière avant de fonder une famille. Plus leur âge avance, plus il est difficile de concevoir, dû à la diminution de la réserve ovarienne (réserve de gamètes) et des problèmes de décidualisation. Vers 40 ans, les ovaires ne répondent plus à la FSH (*hormone folliculo stimulante*) ni à la LH (*hormone lutéinisante*). Avec le temps, la diminution de la quantité des hormones sexuelles, soit la progestérone et l'œstrogène, ainsi que l'insuffisance ovarienne provoquent l'arrêt des menstruations.

Lors du cycle reproductif, l'endomètre va subir des changements, tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose, pour permettre le meilleur environnement possible pour l'implantation de l'embryon (12). La communication entre le futur embryon et les tissus maternels doit être adéquate pour l'implantation et le maintien de la grossesse. Les molécules de signalisation et de réponses cellulaires, permettant cette communication, doivent être parfaitement coordonnées (13, 14). Si une erreur survient, tout le processus reproductif est en danger. En effet, il est possible que la grossesse s'arrête de manière naturelle, ce qui est communément appelé une fausse couche. Ce problème touche environ une grossesse sur cinq, selon Santé Canada (2). L'une des causes principales est un problème au niveau de la réceptivité de l'utérus, affectant la nidification de l'embryon.

Des tests médicaux peuvent être effectués pour déterminer le ou les problèmes de fertilité du couple, tant chez la femme que l'homme. Ces tests sont plus complexes pour les femmes avec une cytologie cervicale, un bilan de la réserve ovarienne, l'hystérosonographie ainsi que des biopsies endométriales alors que chez l'homme, il y a seulement le spermogramme et la fragmentation d'ADN (*acide désoxyribonucléique*) (15). Certes, les problèmes de fertilité se règlent parfois par des moyens médicaux comme la procréation médicalement assistée (PMA). Cependant, avoir recours à ce genre de procédure ne garantit pas une grossesse. En effet, l'implantation peut échouer à la suite de problèmes embryonnaires, telle qu'une anormalité chromosomique (16, 17). Aussi, les couples revoient souvent leur nombre d'enfants à la baisse à cause du coût des

procédures. De plus, tous ces procédures et tests ne parviennent pas toujours à trouver les causes de l'infertilité.

La réceptivité endométriale est un facteur clé dans l'implantation embryonnaire. Lors des biopsies endométriales, des molécules de signalisation sont analysées pour déterminer la fenêtre d'implantation de la patiente. En effet, il existe deux tests commercialisés soit « ERA test », pour *endometrial receptivity array* d'Igenomix et « Win-test », pour *window implantation test* (18). Certaines cliniques de fertilité effectuent leur propre test maison suite à des recherches effectuées dans leur laboratoire comme c'est le cas pour la Clinique Ovo et son test Adhesio (19). Ces tests analysent le gène de SPP1 (*secreted phosphoprotein 1*), une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire et la migration cellulaire pendant l'implantation et IL15, une interleukine régulée par la progestérone qui permet la prolifération du stroma utérin (20-22). En revanche, ces tests moléculaires de l'endomètre n'ont pas encore démontré leur efficacité en ce qui concerne les taux de grossesse suivant un transfert d'embryon. En effet, les patients ayant effectué le test, permettant ainsi un ajustement du moment pour la réceptivité de l'endomètre pour le transfert d'embryon ont eu un taux de grossesse de 33,3%, comparativement aux patientes contrôles (non testées) qui étaient de 35,2% (23). Il serait donc pertinent de continuer les recherches concernant des molécules de signalisation pouvant affecter la fertilité féminine.

1.2 Reproduction chez la femme

L'organe reproducteur de la femme comprend les ovaires, les trompes de Fallope, l'utérus, le col utérin et le vagin (Figure 1.1). Ils ont comme fonctions de permettre la production de gamètes, la sécrétion d'hormones stéroïdiennes, la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde et le support pour la croissance de l'embryon. Les ovaires, ou gonades femelles, se situent dans la cavité abdominale et pelvienne, de chaque côté de l'utérus et contiennent les follicules. Ces derniers sont constitués d'un œuf immature en développement. Les trompes utérines ont une ouverture en forme d'entonnoir et les battements de cils de son épithélium interne permettent de recueillir l'ovocyte. Ces cils

permettent aussi son avancement jusqu'à l'utérus. La partie la plus étroite de l'utérus s'appelle le col utérin et communique avec le vagin. Le vagin reçoit les spermatozoïdes lors des rapports sexuels et permet le passage du bébé lors de l'accouchement. Il communique à l'extérieur avec la vulve (24).

L'utérus est un organe musculeux qui est maintenu dans la cavité abdominale par plusieurs ligaments. Il est constitué de trois couches tissulaires de l'extérieur vers l'intérieur, soit la séreuse, couche formée par un mésothéliome, le myomètre, couche musculaire majoritairement formée de cellules musculaires lisses et l'endomètre, couche formée d'un stroma dont l'épaisseur varie et d'une couche de cellules épithéliales prismatiques ciliées et sécrétoires. L'endomètre peut être subdivisé en sa couche fonctionnelle et en sa couche basale. La couche basale reste constante à travers le cycle menstruel au niveau de l'épaisseur et de la vascularisation, contrairement à la couche fonctionnelle.

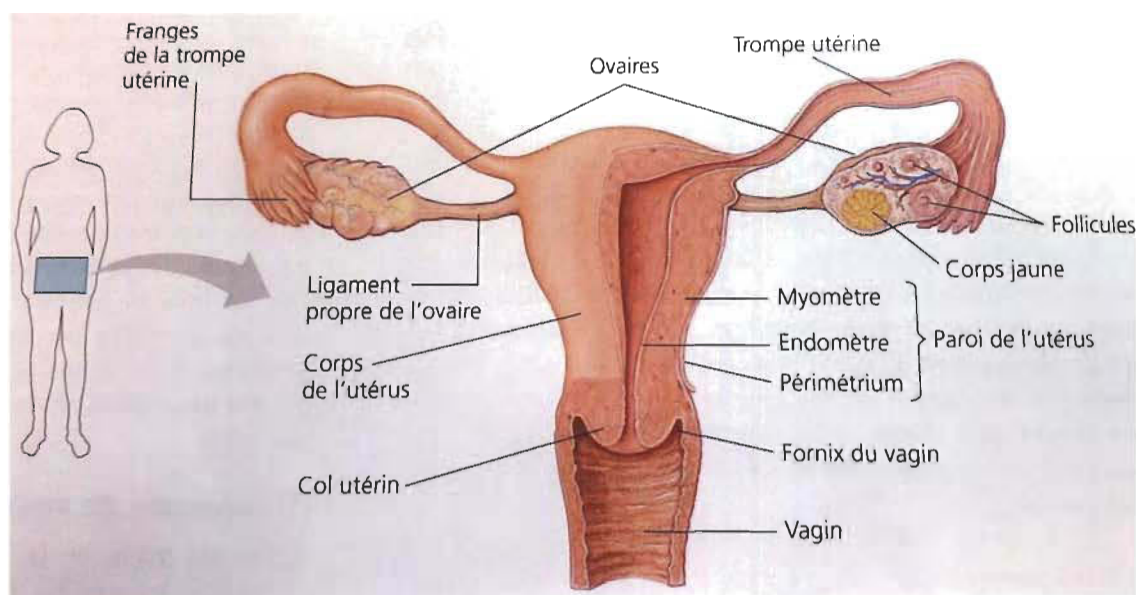


Figure 1.1 Organe reproducteur de la femme (24).

Cette figure démontre les parties principales de l'utérus et des ovaires.

Lors du cycle menstruel, les ovaires et l'utérus subissent des changements cycliques. Chaque cycle menstruel prend environ un mois et implique l'ovogenèse ainsi que la préparation de l'utérus à recevoir un ovule fécondé. Ces changements sont directement

influencés par la GnRH (*guanine nucleotide exchange hormone*) sécrétée de manière pulsative par l'hypothalamus, stimulant la sécrétion de la FSH et LH par l'adénohypophyse, libérées dans le sang et qui viennent stimuler à leur tour les hormones stéroïdiennes (œstrogène et progestérone) sécrétées par ovaires. Ces hormones iront faire une rétroaction négative au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Cette rétroaction permettra de limiter la quantité d'hormones stéroïdiennes présente dans le corps. Le cycle utérin et ovarien s'opèrent en parallèle dans leurs structures respectives, mais sont synchronisés. Le cycle ovarien est une série d'évènements dans les ovaires qui surviennent durant et après la maturation d'un ovule. Pour sa part, le cycle utérin est une série de changements que subit l'endomètre. Ces changements ont pour but de le préparer à l'implantation embryonnaire et de le maintenir jusqu'à l'accouchement.

La reproduction chez la femme commence au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Elle est constituée de l'hypothalamus, de l'hypophyse et des ovaires. L'hypothalamus sécrète de la GnRH. Cette dernière est transportée le long des axones pour activer la sécrétion de LH et de FSH par l'adénohypophyse. Ces hormones aussi appelées gonadotrophines sont libérées dans la circulation sanguine et vont se lier aux cellules gonadiques. La FSH initie le recrutement et la croissance folliculaire alors que la LH va permettre la production d'œstrogène et stimule la maturation des follicules ovariens (ovogenèse) (Figure 1.2). Ainsi, l'activité endocrinienne des ovaires se fait par deux hormones stéroïdiennes, soit l'œstrogène (via les récepteurs à l'œstrogène ER α et ER β) et la progestérone (via les récepteurs PR-A et PR-B). Ces hormones vont faire une inhibition au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, limitant ainsi la quantité d'hormones sécrétées (25). Les ovaires produisent aussi l'inhibine qui est impliquée dans la modulation paracrine de la production d'androgène et d'activine. Cette dernière est en partie responsable de la formation du « pool » de follicules primordiaux. Ces hormones agissent comme molécules de signalisation paracrine intra ovarienne qui régulent la dominance folliculaire lors de la phase préovulatoire. L'activine est un facteur paracrine important dans les premiers stades de croissance folliculaire, avant que les follicules commencent à exprimer des récepteurs à la FSH et ainsi d'acquérir une réactivité à la FSH (26, 27).

Pendant le cycle ovarien, l'ovulation est caractérisée par une dominance d'œstrogène et la période post-ovulation est plus progestative (Figure 1.2). Ce cycle a deux objectifs principaux, soit le transport de l'ovule dans les trompes de Fallope jusqu'à la cavité utérine et le développement de l'embryon. Pendant la phase oestrogénique, ou encore la phase folliculaire, l'ovaire prépare la femme à la réception des spermatozoïdes et à la fécondation. Pendant la deuxième période, la phase lutéale, l'ovaire prépare la femme à accueillir et à nourrir l'embryon au cas où il y aurait fécondation (25).

Dans un cycle menstruel, d'une durée moyenne de 28 jours, il y a quatre phases distinctes, soit la phase menstruelle, celle préovulatoire (entre 6 et 13 jours), l'ovulation (14^e jour) et la phase post-ovulatoire (du jour 15 et 28) (Figure 1.2) (25).

Pendant la phase menstruelle qui dure les cinq premiers jours du cycle. La couche fonctionnelle de l'endomètre se détache et est expulsée du corps (menstruations). Par la suite, l'endomètre sera très mince, car il ne restera plus que la couche cellulaire basale. La phase menstruelle est la période pendant laquelle les hormones ovariennes sont très basses.

Dans les ovaires, les follicules se développent en follicules primordiaux, primaires et secondaires, grâce à l'influence de l'activine. La réponse à la FSH (son pic) apparaît en fin de folliculogénèse pour l'ovulation. Il y a sécrétion des hormones par l'adénohypophyse qui a commencé juste avant le début du cycle. Ainsi la FSH et la LH augmentent de manière progressive et stimulent les ovaires à produire de l'œstrogène (24, 25) (Figure 1.2).

La phase préovulatoire est située entre la fin des menstruations et l'ovulation et est très variable. Vers le 6^e jour, un seul follicule secondaire devient le follicule dominant. Quelques jours avant l'ovulation, il y a un pic d'œstrogène menant à une diminution de FSH. La phase menstruelle et la phase préovulatoire correspondent à la phase folliculaire du cycle ovarien dû à la croissance et au développement des follicules. L'augmentation de la quantité d'œstrogène va permettre l'épaississement du tissu endométrial avec un

apport augmenté de sang (plus vascularisé) et de nutriments (24). Ces nutriments contenus en grande partie dans les glandes endométriales seront utiles pour l'implantation (28). L'influence de l'œstrogène augmente aussi la réceptivité des cellules endométriales à la progestérone en augmentant l'expression des récepteurs de celle-ci.

Le taux élevé d'œstrogène exerce une rétroaction sur les cellules sécrétant la LH et la GnRH, ce qui provoque une libération brusque de LH qui était emmagasinée dans l'hypophyse. Cette libération permet le relâchement de protéases servant à fragiliser la membrane folliculaire, facilitant la rupture du follicule et l'expulsion de l'ovule dans une des trompes de Fallope. Ce pic de LH permet aussi la vascularisation du follicule devenu un corps jaune. L'ovulation survient au 14^e jour du cycle menstruel (24, 25).

La phase post-ovulatoire ou phase lutéale pour le cycle ovarien, se situe entre l'ovulation et les prochaines menstruations, entre les jours 15 et 28. Dans les ovaires, le corps jaune est créé par la LH et stimulé par celle-ci. À la suite de l'ovulation, le corps jaune sécrète majoritairement la progestérone. La progestérone permet de renforcer l'épaississement et le maintien de la couche fonctionnelle de l'endomètre pour s'assurer d'une bonne nidification, en augmentant les sécrétions utérines (24). Les cellules stromales, allongées et fibroblastiques, subiront des changements morphologiques et fonctionnels, appelés décidualisation. Ces changements permettent d'établir la relation nécessaire pour l'interaction fœtus mère. Cette fenêtre d'implantation permet d'offrir un environnement permettant au blastocyste de se lier à la paroi endométriale.

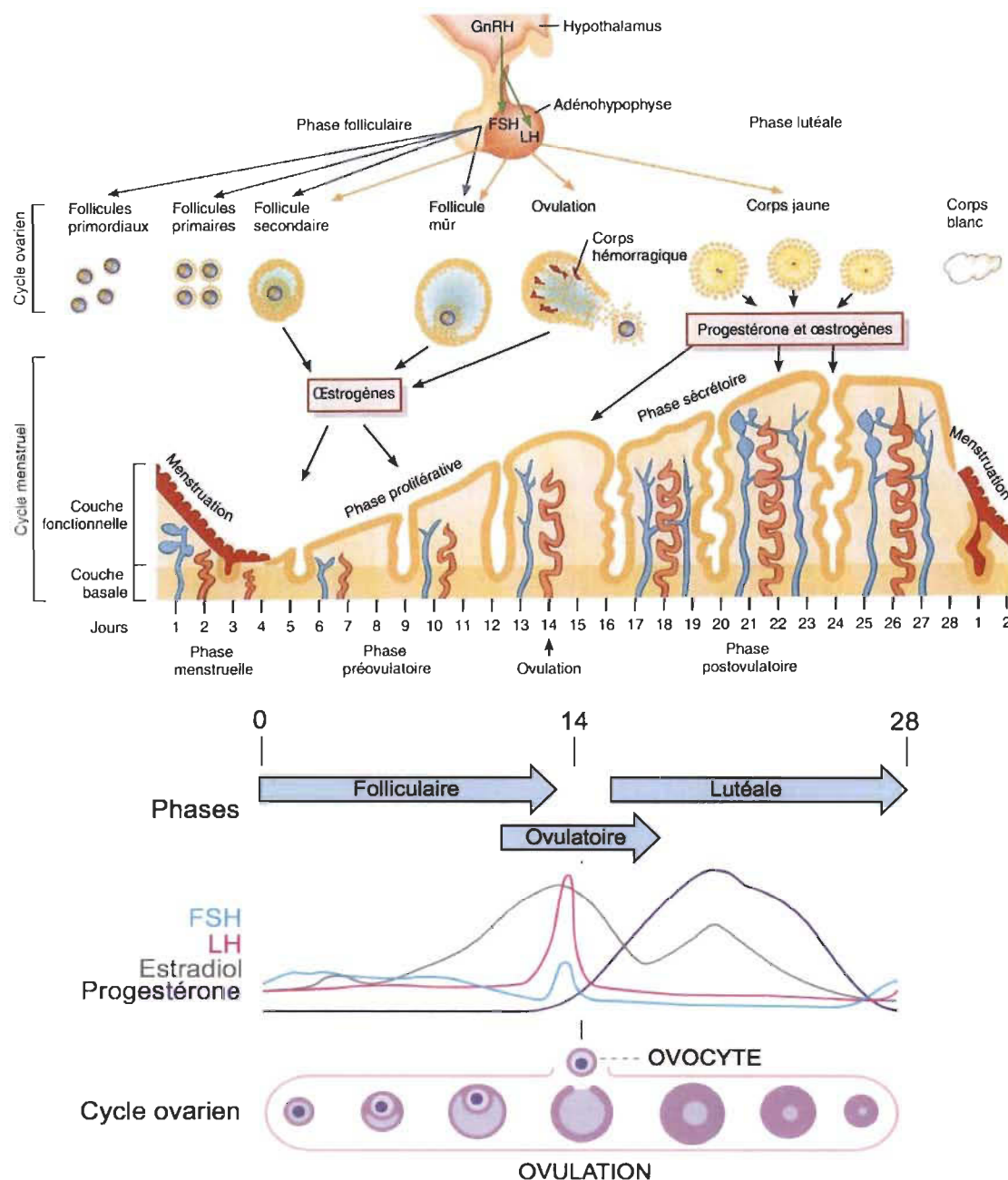


Figure 1.2 Cycle reproducteur chez la femme (29).

Le cycle ovarien et menstruel sont orchestrés par des hormones provenant de l'hypophyse, adénohypophyse et des ovaires. Ces hormones permettent la croissance folliculaire et les changements au niveau de la couche fonctionnelle de l'utérus.

S'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune a une durée de vie d'environ deux semaines. Après ce temps, il se dégrade en corps blanc. Ainsi, les niveaux de progestérone diminuent, augmentant la libération de la GnRH, FSH et LH, causée par la

perte de l'inhibition par les hormones ovariennes. Cette chute rapide d'hormones ovariennes provoque des spasmes dans les artérioles de l'endomètre qui cesse d'être irrigué (24). La couche fonctionnelle de l'endomètre va se rompre et va être expulsée (menstruations), un nouveau cycle commence alors (25).

Cependant, si l'ovule est fécondé, celui-ci commence à se diviser. Le corps jaune persiste et est soutenu par la hCG (*human chorionic gonadotropin*). Cette hormone est produite par le chorion de l'embryon et stimule la sécrétion de progestérone par le corps jaune (25). Dans l'utérus, la progestérone et l'œstrogène permettent la croissance et l'enroulement des glandes endométriales ainsi que l'épaississement de l'endomètre. Les glandes vont alors avoir un pouvoir sécrétoire. Elles vont sécréter du glycogène, des acides aminés et des lipides (30). Cela servira de nutriments à l'embryon, le temps que le placenta se développe. La grossesse dure 40 semaines chez la femme. L'œstrogène qui provient des ovaires est à l'origine de la formation des récepteurs à l'ocytocine dans le myomètre (couche musculaire) dans l'utérus. Le travail pour l'accouchement est caractérisé par des contractions utérines qui mènent à un amincissement de la paroi utérine pour la libération du bébé. Un mécanisme de rétroaction permet cela. L'ocytocine, sécrétée par la neurohypophyse, provoque les contractions utérines entraînant le bébé vers le canal génital. Elle stimule le placenta à produire des prostaglandines qui stimulent à leur tour les contractions utérines. Toutes ces contractions amènent la dilatation du col utérin. La tête du bébé stimule la sécrétion d'ocytocine en mettant une pression sur des mécanorécepteurs situés au niveau du col utérin (24).

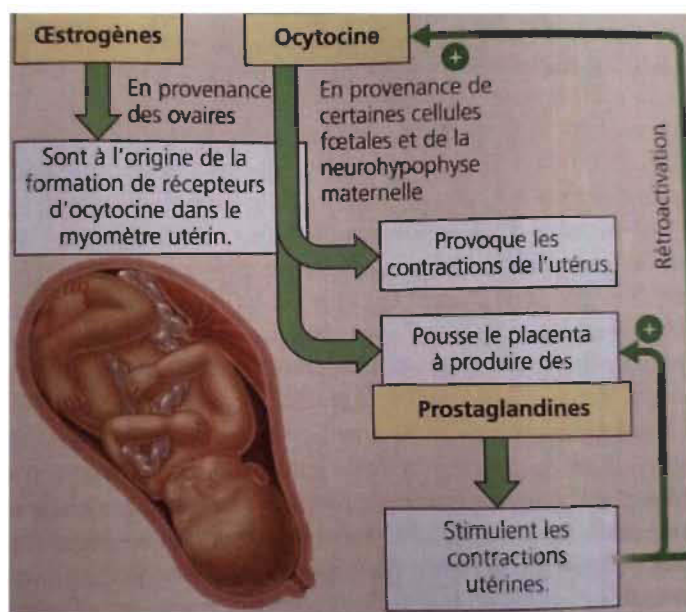


Figure 1.3 Activation hormonale du travail lors de l'accouchement (24).
 L'œstrogène, provenant des ovaires, permet la formation des récepteurs de l'ocytocine dans le myomètre utérin. La stimulation des contractions utérines lors de l'accouchement est une voie de rétro activation de l'ocytocine et des prostaglandines.

1.3 Anatomie du tractus génital femelle chez la souris

L'utérus de la souris est bicorne. Il est composé de deux cornes utérines qui sont liées d'un côté par le vagin via le col vaginal et de l'autre par les ovaires via les oviductes (Figure 1.4). Les oviductes sont divisés en trois parties : pavillon, la partie qui reçoit l'ovocyte lors de l'ovulation; l'ampoule où il y a la fécondation; l'isthme qui permet de se connecter aux cornes utérines (31).

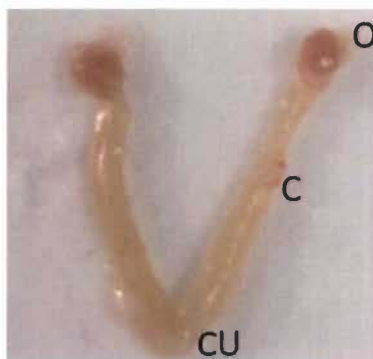


Figure 1.4 **Système reproducteur de la souris** (photo du laboratoire du Dr Asselin).
Légende : O = ovaire; C = corne utérine; CU = corps utérin.

Les cornes utérines sont composées de trois couches : l'endomètre, le myomètre et la séreuse, comme chez la femme. L'endomètre, la partie la plus interne, est constitué de deux types cellulaires, soit la couche de cellules épithéliales et les cellules stromales. Les glandes endométriales sont situées dans ce stroma. Le myomètre est constitué de deux couches de muscles, soit les muscles circulaires lisses et les muscles lisses. Finalement, la séreuse est constituée de tissus conjonctifs élastiques (31).

Le col utérin lie les cornes utérines au vagin. Le vagin s'ouvre sur les lèvres de la vulve, qui fait partie de l'organe sexuel externe de la souris femelle. Le vagin est constitué de trois couches, soit la muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est composée de cellules épithéliales stratifiées squameuses. Les cellules épithéliales sont influencées par les hormones au cours du cycle ovarien (31). Cela permet de différencier les phases œstrales grâce à un simple frottis vaginal (32).

1.4 Cycle ovarien chez la souris femelle

Une raison ayant influencé le modèle animal choisi pour cette étude, la souris C57BL/6, est la ressemblance entre leur cycle reproducteur et celui de la femme. Les liens entre les modifications structurales, au niveau de l'ovaire et de l'utérus) et hormonales (œstrogènes, progestérone, LH et FSH) sont très similaires à ceux retrouvés chez la femme (Figure 1.5).

Similarités	Différences
Couches utérines (myomètre, endomètre)	Nombre de jour du cycle (28 vs 5)
Quantité de phase dans le cycle (4)	Menstruation (présente vs non présente)
Variation hormonale (E2, progestérone, LH, FSH)	Grossesse (9 mois vs 21 jours)
Modification utérin lors du cycle	Quantité d'embryons
Croissance folliculaire	
Ovulation	

Figure 1.5 Similarité et différences entre le cycle menstruel féminin et le cycle œstral de la souris (figure du laboratoire du Dr Asselin).

Les similarités entre le cycle menstruel et le cycle œstral permettent de démontrer que la souris est un bon modèle animal dans le cas de cette recherche.

1.4.1 Les phases du cycle œstral

Pour cette recherche, la souris C57BL/6 a été utilisée. Elle présente plusieurs avantages dont sa taille et le court cycle reproducteur. Sa taille permet de faciliter son hébergement et de sa manipulation lors des expériences. De plus, il existe plusieurs similitudes entre le cycle œstral murin et le cycle menstruel chez la femme. Les mêmes variations hormonales et l'ovulation sont observées dans les deux cas. Cependant, les souris n'ont pas de menstruations. Leur épithélium luminal et les vaisseaux sanguins involuent dans l'endomètre, sans être expulsé à l'extérieur de l'organisme et les cellules mortes et débris cellulaires sont nettoyées par les leucocytes (31).

Le cycle œstral de la souris dure de 4 à 5 jours. Ce cycle est caractérisé par quatre phases : le diestrus (24 à 48 h), le proestrus (24 à 36 h), l'œstrus (20 h) et le metestrus (20 h) (31). Chaque phase est modulée par les hormones sexuelles (Figure 1.6) (33). En proestrus, il y a un pic de FSH et de LH et les niveaux d'œstrogène sont à un maximum. Il y a maturation des follicules et la prolifération de l'endomètre. En œstrus, il y a l'ovulation, ce qui est démontré sur la figure 1.6. En effet, l'ovaire est plus foncé, causé par la rupture du follicule, permettant la libération de l'ovule. Il y a une grande quantité de récepteurs à la progestérone. L'utérus est épais et l'activité glandulaire est à son maximum. Il est prêt à accueillir un futur embryon. Dans ces deux premières phases, il y a présence de prolactine. Cette hormone permet la production de lait par les glandes

mammaires, mais elle est aussi essentielle pour le soutien du corps jaune, favorisant la production de progestérone et le maintien de la gestation (34). Finalement en metestrus, la présence du corps jaune permet le maintien de la grossesse grâce à la sécrétion de progestérone. Les concentrations plasmatiques d'œstrogène diminuent. L'utérus est moins épais et rougeâtre (Figure 1.7). En diestrus, il y a un pic de progestérone et une augmentation des niveaux d'œstrogène. L'utérus est allongé, mince et rougeâtre. Dans ces deux dernières phases, la progestérone inhibe la sécrétion de LH (31).

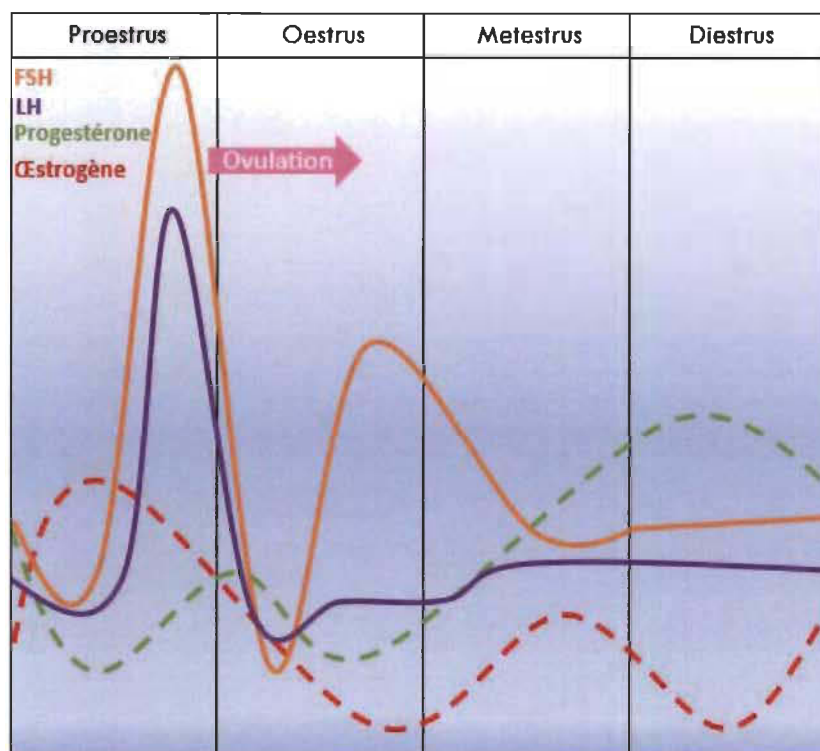


Figure 1.6 Cycle hormonal chez la souris (adaptation du livre (31)). Dans chaque phase du cycle œstral, il y a des variations hormonales qui permettent la prolifération utérine et la croissance folliculaire.

L'accouplement chez les souris se fait majoritairement la nuit. Il y a deux manières de s'assurer d'une gestation. Premièrement, l'analyse du frottis vaginal révélera des spermatozoïdes à la suite d'un accouplement. Deuxièmement, il y aura un bouchon muqueux au niveau vaginal. Ce bouchon, appelé « plug », est constitué de sperme coagulé.

1.4.2 Différenciation des phases par un frottis vaginal

Chaque phase du cycle reproducteur est bien distincte chez la souris. C'est pour cette raison qu'il est possible de les analyser grâce à un frottis vaginal (Figure 1.8). En récupérant les cellules du vagin, il est possible de savoir le moment du cycle (32). En proestrus, le début du cycle, il y a prédominance de cellules épithéliales nucléées et l'endomètre prolifère (Figure 1.8). En œstrus, il y a une grande quantité de cellules anucléées, larges et irrégulières. Ce sont des cellules cornifiées. Elles sont remplies de sécrétions à un point tel qu'elles ont expulsé leur noyau. Ces sécrétions vont être utilisées lors de la future implantation et celles-ci vont se dégrader après avoir libéré leurs sécrétions. Cependant, s'il n'y a pas fécondation, ces cellules anucléées s'autodétruisent rapidement (35). En metestrus, il y a un début d'inflammation causée par la mort de ces cellules. Celles-ci deviennent fusiformes, car il y a une dégénérescence de leur membrane plasmique. En diestrus, il y a présence de leucocytes polynucléaires en grande quantité. En effet, c'est la fin du cycle et les leucocytes nettoient l'utérus en récupérant les cellules mortes. Il y a de l'inflammation causé par celles-ci, c'est pour cette raison que l'utérus est rouge (31).

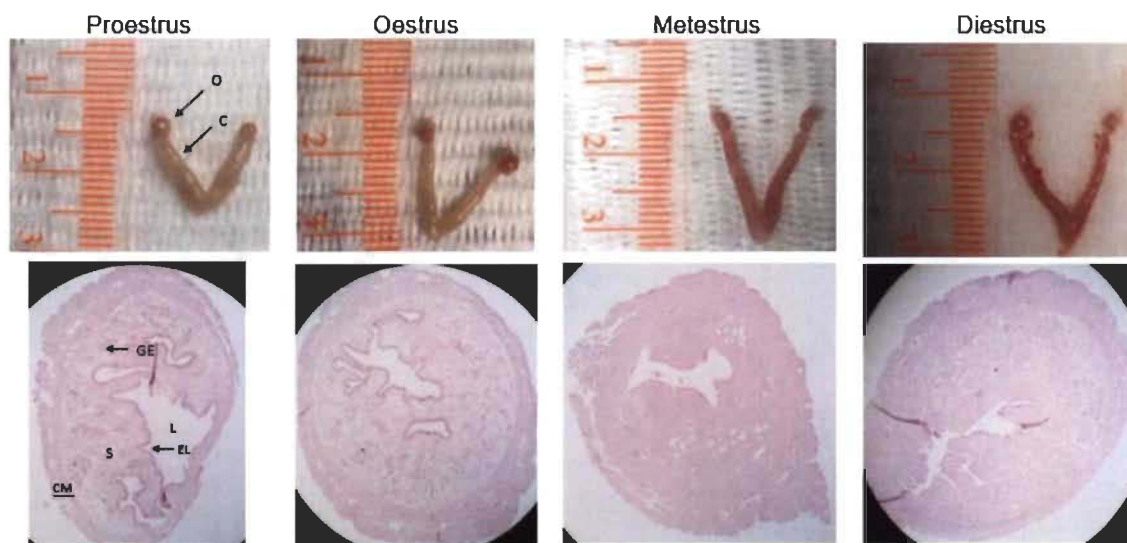


Figure 1.7 Utérus et coupes utérines de la souris (photos du laboratoire du Dr Asselin).

Légende : O = ovaire; C = corne utérine L = lumière; S = stroma; EL = épithélium luminal; GE = glande endométriale; CM = couches musculaires.

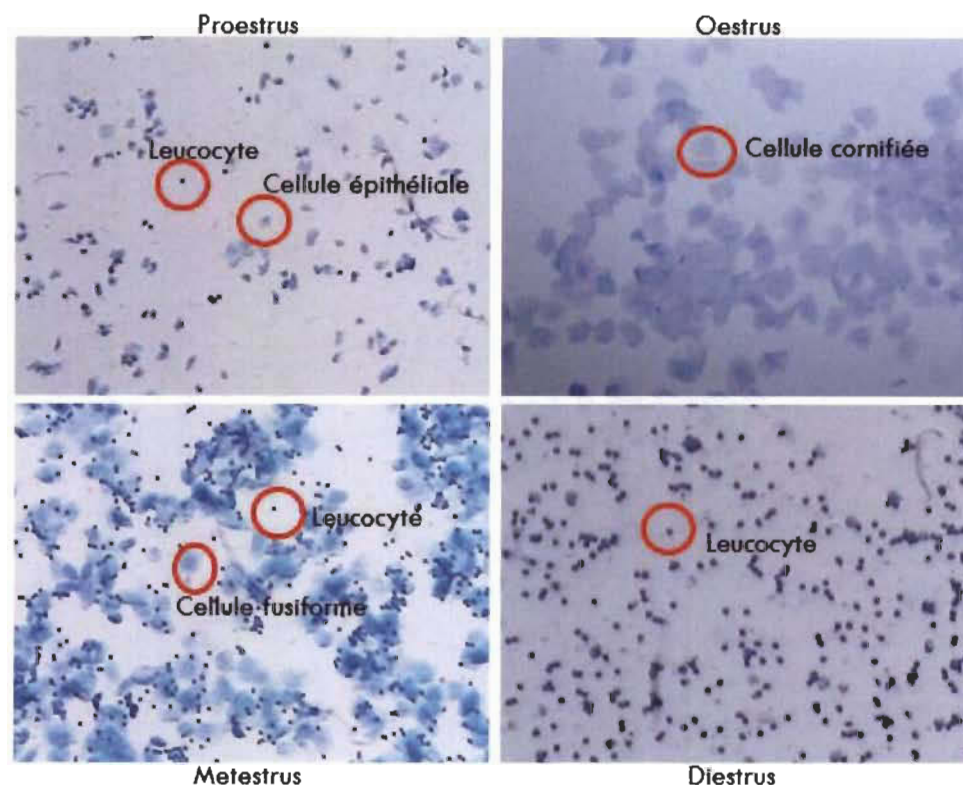


Figure 1.8 Frottis vaginal d'une souris (photos du laboratoire du Dr Asselin). Plusieurs types cellulaires sont présents au niveau vaginal chez la souris. Ces types cellulaires varient cycle œstral, ce qui permet d'identifier les phases du cycle avec un frottis vaginal.

1.5 Voie de signalisation PI3K/Akt

La voie de signalisation PI3K/Akt (*phosphatidylinositol-3-kinase*) est impliquée dans divers mécanismes de prolifération, de croissance cellulaire, de survie, de synthèse protéique, de migration, d'invasion cellulaire et de métabolisme du glucose (Figure 1.8). Une mutation dans cette voie peut causer de graves maladies telles que le cancer. En effet, des mutations peuvent venir activer la voie de signalisation en activant de manière constitutive les facteurs de survie cellulaire et en inhibant des facteurs proapoptotiques. C'est l'une des raisons pour laquelle cette voie est grandement étudiée (36). Plusieurs facteurs extracellulaires peuvent venir activer cette voie, tels que les hormones et certains facteurs de croissance (37, 38), via des récepteurs tyrosine kinases, récepteurs couplés à une protéine G, des récepteurs de cytokines, intégrines ou récepteurs de cellules B ou T (39).

1.5.1 Signalisation cellulaire de la voie PI3K/Akt

Lorsqu'un ligand se fixe à un récepteur tyrosine-kinase, cela amène sa dimérisation. Ensuite, il y a activation par transphosphorylation de la partie intracellulaire du récepteur. À la suite de son activation, cette partie sert d'ancrage à des protéines adaptatrices comme GAB1 (*Growth factor receptor-bound protein 2 associated binding protein 2*), qui permet la transmission de la cascade de signalisation vers d'autres protéines comme PI3K (40). La protéine PI3K est une kinase lipidique qui phosphoryle PIP2 (*phosphatidylinositol 2-phosphate*) (présentes dans les endomembranes) qui est ancrée à la membrane plasmique de la cellule. Une fois que le PIP3 (*phosphatidylinositol 2-3-phosphate*) (PIP2 phosphorylé) est formé, la kinase PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*) est recrutée à la membrane et celle-ci permet l'activation d'Akt, en le phosphorylant. mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) phosphoryle aussi Akt. Celle-ci devient active (phospho-Akt), et peut alors migrer dans d'autres parties de la cellule pour activer ou inhiber d'autres protéines de signalisation comme Bad, mTORC1, FoxO1. La régulation négative de cette voie est effectuée par des phosphatases comme PTEN, qui déphosphoryle PIP3 en PIP2. Il existe des phosphatases qui régulent Akt directement, soit PP2A (thréonine 308) (*proteine phosphatase 2A*) et PHLPP (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase*) (serine 473).

1.5.2 Activation d'Akt

Akt, aussi connu sous le nom de PKB (*protéine kinase B*) est une sérine/thréonine kinase qui est activée majoritairement par la voie de signalisation PI3K en réponse à des stimuli extracellulaires (Figure 1.9) (41). Akt est composé de trois régions différentes, soit le domaine d'homologie PH en N-terminal, un domaine catalytique central et un motif hydrophobique en C-terminal (Figure 1.10) (42). Le domaine PH a un site de liaison pour les PIP3 et PIP2, ce qui permet le recrutement d'Akt à la membrane, qui est essentiel à l'activation d'Akt. Le domaine C-terminal quant à lui permet de réguler l'activité kinase d'Akt, car il contient un site de liaison pour la kinase activatrice PDK1. La relocalisation d'Akt du cytoplasme à la membrane plasmique permet un changement de conformation qui dévoile les sites catalytiques. Quand Akt est recrutée à la membrane plasmique,

elle est phosphorylée sur sa thréonine 308 (dans le domaine catalytique) par PDK1 (43). Cela amène un changement de conformation de la protéine rendant ainsi disponible son deuxième site de phosphorylation pour mTorC2 (44). Ainsi, ce dernier peut venir phosphoryler la sérine 473 (motif hydrophobique). Il faut que les deux sites soient phosphorylés pour qu'Akt soit pleinement active. La position de la thréonine et sérine varie dépendamment de l'isoforme d'Akt phosphorylée. Certains auteurs suggèrent que la phosphorylation de la thréonine par PDK1 peut être suffisante pour l'activation d'Akt (45). Cependant la deuxième phosphorylation (par mTorC2) semble être nécessaire pour stabiliser Akt et la protégerait de la dégradation (46). Après son activation, Akt est libérée de la membrane plasmique et peut aller activer d'autres molécules afin de réguler diverses fonctions cellulaires.

La régulation négative d'Akt se fait par des phosphatases. PP2A est connue pour déphosphoryler la thréonine 308 et PHLPP est une enzyme de déphosphorylation pour la sérine 473. Cette dernière existe sous deux formes, PHLPP1 et PHLPP2. Elles sont spécifiques à certaines isoformes d'Akt. En effet, PHLPP1 déphosphoryle Akt2 et Akt3 alors que PHLPP2 déphosphoryle Akt1 et Akt3 (47). Une autre phosphatase permet l'inactivation d'Akt, soit PTEN. Il déphosphoryle spécifiquement la position 3' de l'anneau d'inositol.

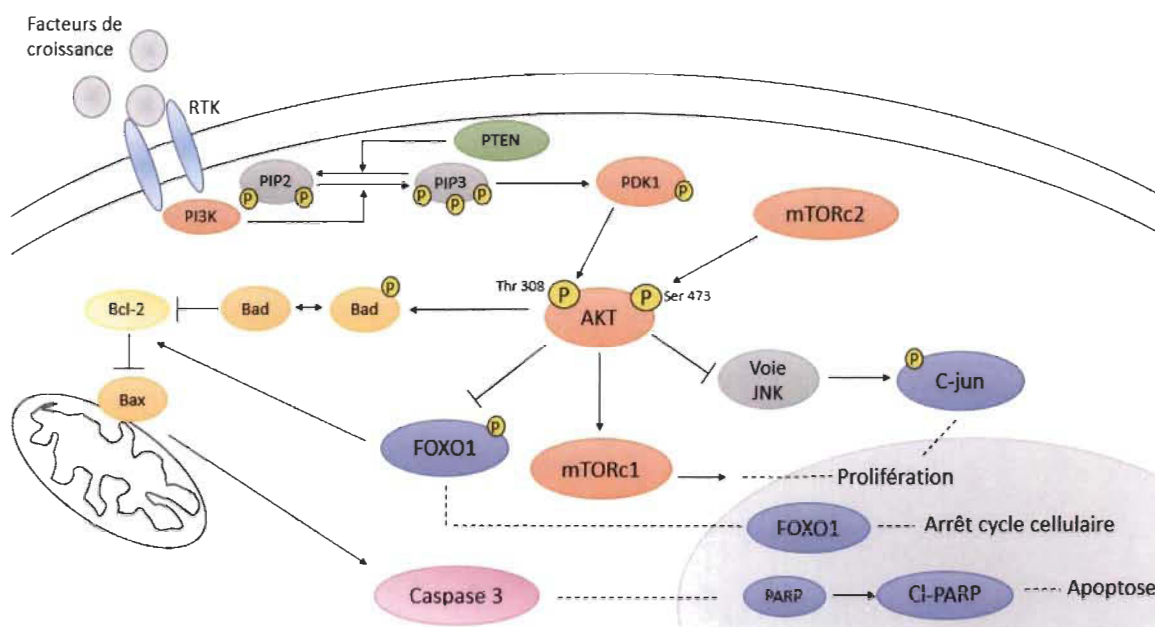


Figure 1.9 Voie de signalisation simplifiée d'Akt (figure du laboratoire du Dr Asselin).

Cette voie simplifiée d'Akt identifie les molécules de signalisation qui seront étudiées dans cette recherche.

1.5.3 Isoformes d'Akt

Akt existe sous trois formes, soit Akt1, Akt2 et Akt3 (Figure 1.10). Elles sont codées par trois gènes distincts, localisés sur différents chromosomes ayant environ 80 % d'homologie d'acides aminés structurels et fonctionnels (48, 49). La spécificité des isoformes permettrait la grande variation de fonction de cette protéine. En effet, des études ont démontré que des souris KO pour l'isoforme Akt1 augmente la mortalité à la naissance et diminue la masse corporelle d'environ 20 à 30% (50). Pour les souris KO Akt2, elles développeraient un diabète de type 2, ce qui suggère qu'Akt2 serait impliqué dans le métabolisme du glucose (51). Finalement, les souris KO Akt3 démontrent une diminution de la taille du cerveau, une diminution de la quantité et de la taille des cellules en est la cause (52, 53). La combinaison de différentes isoformes mènerait à divers résultats. Une étude a démontré que des souris doubles KO pour Akt1 et Akt3 seraient létales au niveau embryonnaire, à la suite de graves problèmes de croissance et de développement du système cardiovasculaire et nerveux. Lors de l'absence d'Akt1 et d'Akt2, les souris se développent à terme, mais elles meurent peu de temps après la naissance. En effet,

ces souris ont leurs muscles squelettiques atrophiés, des délais d'ossification et une diminution de croissance d'environ 50 %. Les effets de la délétion d'Akt1 et Akt2 ou d'Akt1 et Akt3 ont de fortes interactions. Contrairement aux souris KO Akt2-3 ont un développement normal malgré leur dysfonction additive (diabète et diminution de la taille du cerveau), malgré une grande diminution d'Akt dans les tissus. Il a été démontré qu'un seul allèle d'Akt1 serait suffisant pour son activation (phosphorylation) dans le développement et la survie de l'embryon. Cette même étude a démontré que les KO n'affectaient pas la localisation des autres isoformes, ainsi chacun a sa fonction spécifique dépendamment de leur localisation ou de leurs cibles protéiques (54).

L'interaction intramoléculaire dans le domaine PH est très importante pour maintenir Akt inactif. Une mutation d'activation dans son domaine PH a été rapportée dans certains cancers du sein, à une fréquence d'environ 4 à 8 % (49). La spécificité de signalisation des isoformes d'Akt pourrait venir du domaine PH et du domaine catalytique (49). Il a été démontré que les isoformes d'Akt ont des localisations cellulaires différentes. Akt1 serait localisée au niveau du cytoplasme et serait relocalisée lors de son activation à la membrane plasmique. Akt2 serait colocalisée avec les mitochondries et associée aussi aux récepteurs GLUT (*glucose transporter*) alors qu'Akt3 serait localisé sur la membrane nucléaire. Ces différences de localisation dans la cellule des isoformes d'Akt suggèrent qu'Akt2 et Akt3 seraient activées d'une autre manière que les mécanismes actuellement proposés dans la littérature scientifique. Bien qu'il y ait une similarité dans leur séquence, leur alignement montre qu'il existe trois régions présentant une diversité de séquence (Figure 1.10). Par conséquent, ces régions peuvent être impliquées dans la régulation de leur localisation et de leur fonction spécifique (49, 55, 56).

De plus, une population mTorC2 dépendante de PI3K semble exister à la surface des mitochondries. En effet, il se pourrait que les isoformes d'Akt puissent se regrouper autour de ces organelles et activer diverses populations de mTorC2, en fonction de leur domaine PH distincts (57). Des expériences conduites dans des cellules double KO pour Akt1 et Akt2 ont démontré que la substitution du site PH d'Akt1 par celui d'Akt2 induisait un ralentissement significatif de la progression dans le cycle cellulaire. Cet effet est non

observable lorsque le domaine PH d'Akt2 était substitué par celui d'Akt1 (58). Cela suggère que le domaine PH d'Akt1 est suffisant pour activer les voies de signalisation propre à Akt1. La présence du domaine PH d'Akt1 sur Akt2 suffit à sauver le phénotype du KO Akt1. Donc, il est possible de croire que grâce à leurs domaines PH différents, chaque isoforme se localisera à la surface de certaines membranes plasmiques, endosomales ou mitochondriales. Il est connu qu'Akt se distribue dans plusieurs compartiments cellulaires et certaines isoformes sont plus spécifiques à certaines organelles. Une étude a utilisé un rapporteur fluorescent codé génétiquement pour l'activité d'Akt qui a permis l'imagerie en temps réel de sa phosphorylation. Cela a démontré que la signalisation dans le noyau était moins rapide que celle dans le cytosol, ce qui suggère que la signalisation d'Akt dans ces deux compartiments est régulée par des mécanismes différents (59).

Akt a plusieurs fonctions redondantes, ce qui permet de compenser la fonction d'une pour l'autre. C'est-à-dire qu'en l'absence d'une isoforme d'Akt, une autre isoforme peut effectuer le même travail que celle absente. Certaines fonctions non redondantes d'Akt ont aussi été explorées *in vitro* avec des ARN (*acide ribonucléique*) interférents et des inhibiteurs spécifiques d'isoformes. Cette étude a permis de trouver un substrat spécifique à Akt2, soit Ankrd2 (*Ankyrin Repeat domain 2*). Celui-ci aurait des rôles régulateurs et structurels dans les voies de réponses au stress musculaire (fibres musculaires squelettiques et cardiaques) (60).

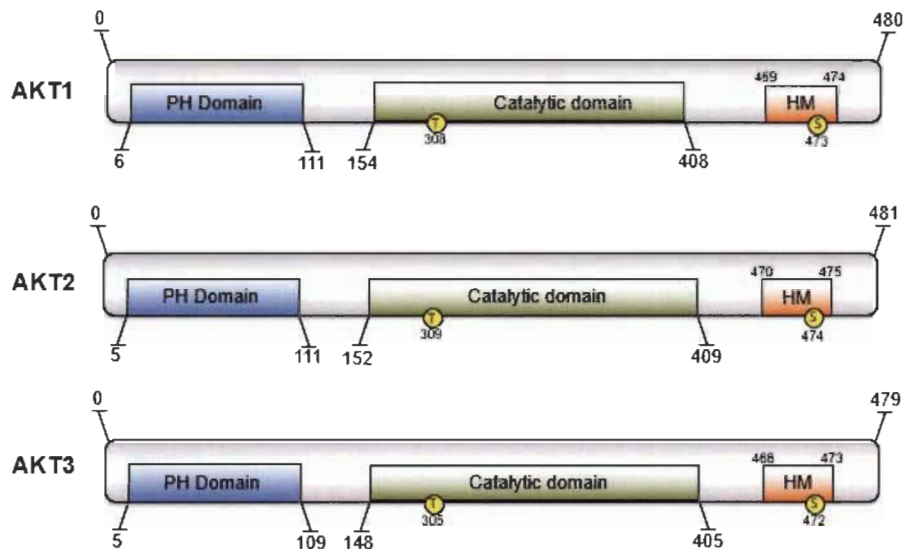


Figure 1.10 Structure des isoformes d'Akt (48).

Les trois isoformes d'Akt ont une grande similarité structurale, au niveau du domaine PH, du domaine catalytique et HM.

1.5.4 Akt dans la reproduction

Au niveau de la reproduction, Akt est une kinase qui est activée par des facteurs de croissance comme l'œstrogène. L'œstrogène a un effet direct sur la voie PI3K/Akt en augmentant la phosphorylation d'Akt dans les cellules endométriales, affectant la prolifération et l'effet anti-apoptotique (61). Akt serait aussi impliqué dans la survie cellulaire et dans la modulation de la matrice extracellulaire de l'endomètre. Akt serait activée lors des menstruations, de l'implantation embryonnaire et de la décidualisation chez l'humain (62, 63). De plus, des études dans notre laboratoire ont été menées pour démontrer son importance dans la gestation et la pseudo gestation (64) ainsi que dans la décidualisation (65). Cependant, toutes ces recherches n'analysent pas de manière isoformes spécifiques. C'est-à-dire que nous savons qu'Akt a un rôle dans la reproduction, sans savoir le rôle propre à chaque isoforme.

1.6 Apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée (autodestruction) qui est presque aussi fondamentale que la prolifération cellulaire. Elle sert au maintien de

l'homéostasie en empêchant l'établissement d'une infection ou en éliminant les cellules infectées, endommagées ou mutées (66). Au niveau de la reproduction, elle survient lors de l'implantation embryonnaire. En effet, lors de l'invasion du blastocyste, le couche en périphérie du trophoblaste, le syncytiotrophoblaste, sécrète des facteurs enzymatiques lytiques qui lui permettent d'induire l'apoptose des cellules épithéliales de la muqueuse utérine. Ainsi, il peut traverser la lame basale et pénétrer dans le stroma pour entrer en contact avec les vaisseaux sanguins utérins (8).

L'apoptose est caractérisée par des changements morphologiques, moléculaires ainsi que biochimiques. Il y a la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, la formation de vacuole, le bourgeonnement de la membrane plasmique et nucléaire ainsi que le clivage intracellulaire de multiples protéines (67). Cela permet une destruction organisée des cellules avec une inflammation négligeable, laissant seulement des débris cellulaires. Plusieurs stimuli peuvent activés la mort cellulaire, mais tous finissent par activer les caspases (*cysteine containing aspartate specific proteases*), pour induite l'étape finale de l'apoptose.

1.6.1 Caspases

Les caspases sont des enzymes protéolytiques, c'est-à-dire que lorsqu'elles sont activées, elles hydrolysent les protéines. Après leur activation, les caspases travaillent en coopération pour produire les altérations cellulaires apoptotiques. Chez l'humain, onze caspases ont été identifiées et ces protéases cystéines semblent constituer un système protéolytique complexe. Les caspases sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives (procaspases) qui nécessitent un processus protéolytique au niveau des résidus aspartates internes pour avoir une activité catalytique complète. Elles sont donc activées par le clivage des liens peptidiques, en deux sous-unités; une grande et une petite, qui dimérisent pour former un hétérotétramère actif. C'est pour cette raison qu'une caspase activée est appelée « *cleaved caspase* (cl-casp) ». Les caspases reconnaissent une séquence particulière sur certaines protéines et hydrolysent la liaison peptidique côté carboxyle d'un résidu aspartate. Dans la cascade d'activation, certaines caspases

s'autoactivent ou en clivent d'autres de façon à les activer (Figure 1.11) (68). Les caspases exécutrices permettent la mort cellulaire en activant des caspases initiatrices.

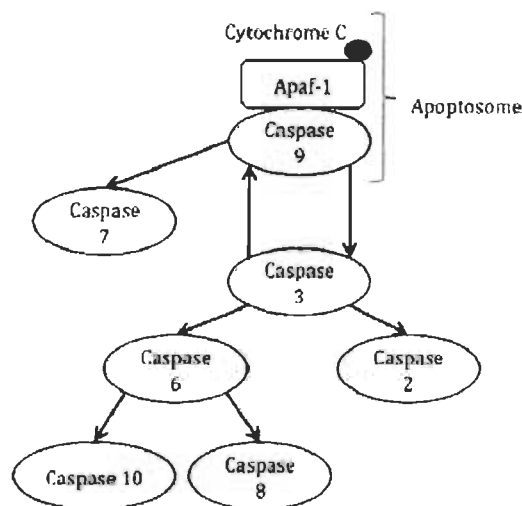


Figure 1.11 Cascade d'activation des caspases (Figure du laboratoire du Dr Asselin). La cascade d'activation de plusieurs caspases à la suite de l'activation de l'apoptosome par le cytochrome C.

1.6.2 Voie de signalisation des caspases

Il existe deux types de voie de signalisation par lesquelles les caspases vont être activées pour faire l'apoptose, soit la voie extrinsèque et intrinsèque (Figure 1.12). La voie extrinsèque implique les récepteurs de la mort cellulaire et leurs ligands. Les principaux récepteurs sont Fas-R (*TNF superfamily receptor 6 – receptor*) ainsi que son ligand (Fas-L) et TNFR1 et TNFR2 (*tumor necrosis factor α receptor 1-2*) avec leur ligand TNF- α (*tumor necrosis factor α*). Ces récepteurs contiennent un domaine intracytoplasmique (domaine de la mort cellulaire) qui peut, à la suite de la liaison d'un ligand, recruter des protéines adaptatrices pour permettre l'activation de la procaspase 8.

La voie intrinsèque comprend la liaison du cytochrome C (libéré dans le cytoplasme) à Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) permettant son activation (69). Ces deux molécules se lient ensuite à la caspase 9 (caspase initiatrice) pour former l'apoptosome. Finalement, l'apoptosome va induire l'activation des autres caspases,

les exécutrices (68). La famille des protéines BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) contrôle l'activation de cette voie. Elle régule aussi les récepteurs de la mort cellulaire dans la voie extrinsèque (68). La formation de complexe permet de contrôler la balance entre la mort cellulaire et la prolifération (70). La voie intrinsèque est sensible au stress toxique et dépend des fonctions de la mitochondrie alors que la voie extrinsèque implique des récepteurs transmembranaires qui répondent à des signaux provenant de l'extérieur de la cellule. La protéine Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) est le seul lien entre les deux voies une fois activées. Dans les deux cas, l'exécutif définitif semble être la caspase 3 (71).

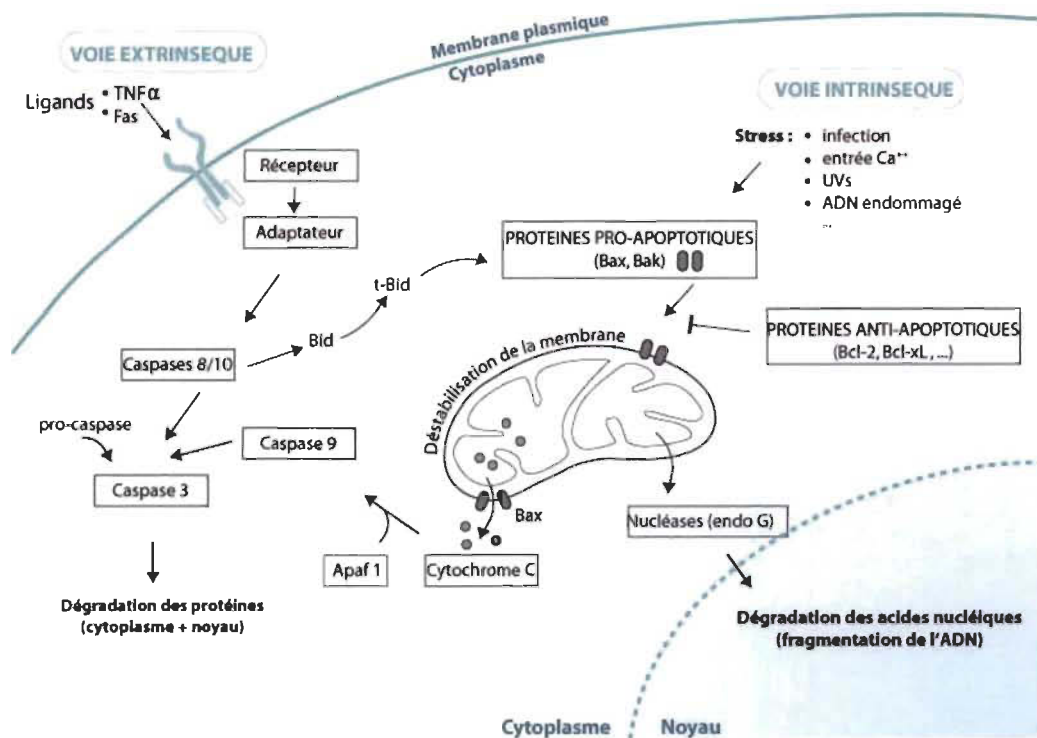


Figure 1.12 Voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose dans une cellule (72).

Il y a deux manières pour l'activation de l'apoptose, soit au niveau intrinsèque (stimulé par un agent stressant) et extrinsèque (stimulé par des ligands extérieurs).

1.6.3 Famille BCL-2

La famille de protéines Bcl-2 a deux principales fonctions, soit anti- apoptotique (exemple Bcl-2, Bcl-xL (*BCL-2 like 1*)) ou proapoptotique (exemple Bax (*BCL-2*

associated X), Bad (*BCL-2 associated agonist of cell death*)) (68). Ces dernières sont subdivisées en celles ayant un seul domaine BH3 et celles qui en ont plusieurs. Les protéines qui ont seulement un domaine (exemple Bad) sont des capteurs pour les signaux de mort et sont capables d'activer les protéines à plusieurs domaines. Elles permettent de transmettre le signal jusqu'aux mitochondries (73).

Les protéines qui font partie de la famille Bcl-2 sont capables de dimériser avec elles-mêmes et d'autres membres. Ces interactions servent de mécanisme de régulation, permettant une balance entre les facteurs pro- et anti- apoptotiques (73).

Bcl-2 empêche le relâchement du cytochrome C par la mitochondrie, inhibant ainsi l'apoptose. Cette protéine est inhibée par la protéine Bad. L'activité de la protéine proapoptotique Bad dépend de sa phosphorylation. S'il y a présence de facteurs de croissance, Bad peut être phosphorylée. Quand celle-ci est phosphorylée, elle est liée à la protéine cytosolique 14-3-3 qui la séquestre. Il y a deux sites de phosphorylation de Bad, soit la serine 136 et la sérine 112. Ces sites sont phosphorylés par Akt et une cascade de signalisation de protéine kinase via ERK respectivement (74). Sa dissociation avec la protéine de séquestration (14-3-3) et sa déphosphorylation permettent sa translocalisation à la mitochondrie et contribuent à l'activation de la mort cellulaire via la libération cytochrome C (68, 75).

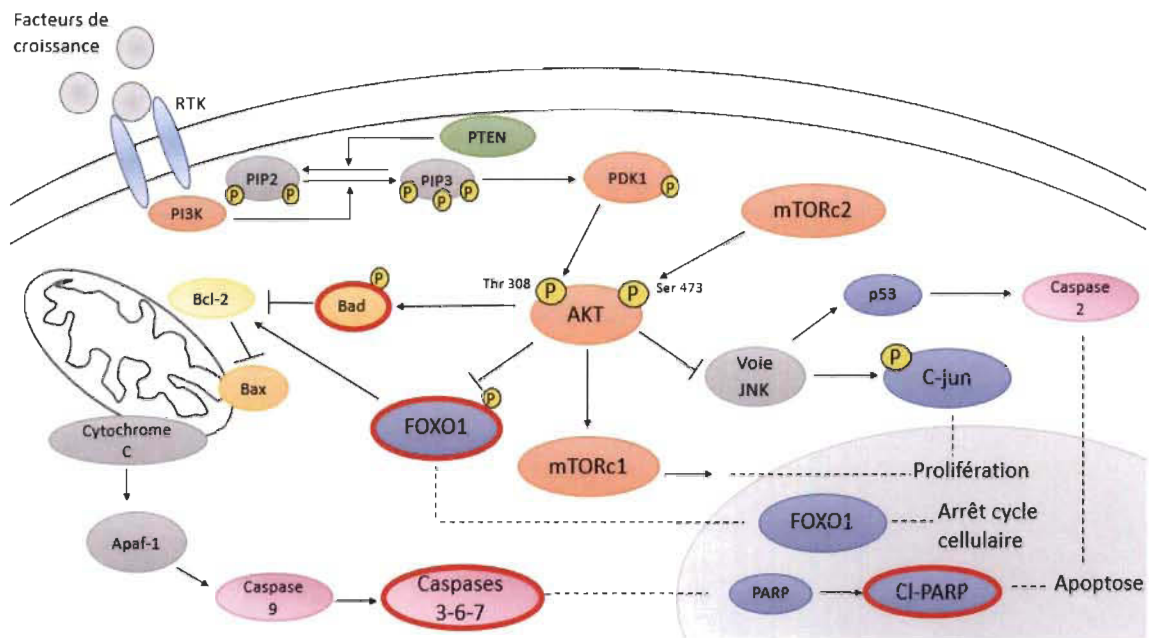


Figure 1.13 Voie de signalisation simplifiée de l'apoptose (figure du laboratoire du Dr Asselin).

Akt permet l'inhibition de l'apoptose en phosphorylant Bad, ce qui inhibe l'activation de BCL-2 et donc de la cascade des caspases et PARP.

1.6.4 PARP

La famille des protéines PARP (*poly-ADP-ribose polymerases*), constituée de PARP1 à 18, qui sont des enzymes nucléaires qui sont impliqués majoritairement dans la réparation de l'ADN. Ces lésions de l'ADN peuvent être causées par des processus endogènes ou exogènes (Figure 1.13) (76). Sa fonction est de lier l'ADN simple brin ou les coupures d'ADN double brin et de les amener au système enzymatique chargé de réparer l'ADN. PARP a une fonction dans la régulation de transcription et dans la stabilité du génome (77). PARP est activée en réponse immédiate de l'apparition d'ADN simple brin (78). Quand l'ADN est trop endommagé, la cellule induit son apoptose en activant des protéases telles que les caspases. Ces dernières viennent cliver PARP et d'autres substrats apoptotiques (75, 76, 79). PARP est activée par clivage par les caspases telles que la caspase 3 durant l'apoptose. PARP serait aussi impliquée dans l'implantation embryonnaire et dans la décidualisation, sous le contrôle de l'œstrogène. En effet, PARP et sa forme activée (cl-PARP) subissent une augmentation de leur expression lors de

l'implantation (80). PARP serait impliqué dans la différenciation cellulaire, la prolifération et le remodelage de tissus (81).

1.6.5 FoxO1

La famille des protéines FOXO (*forkhead box protein*) est constituée de plusieurs protéines (Foxo1, 3a, 4 et 6) agissant comme facteurs de transcription. Elles ont un grand degré de similarité structurel et fonctionnel. Ces protéines sont capables de réguler la modélisation de la chromatine et de permettre l'expression de ses gènes cibles. FoxO1 est un facteur de transcription régulant des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la résistance au stress oxydatif et à l'apoptose (82, 83) (Figure 1.14).

L'implication de la protéine FoxO dans l'apoptose a été établie lors de la découverte de sa phosphorylation par Akt pour ainsi activer le promoteur de FasL (84). FoxO régule des gènes proapoptotiques tels que TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et la famille BH3 (Bad) (39). Akt phosphoryle Bad au niveau de trois sites, soit la thréonine 24, la sérine 256 et 319. La régulation du fonctionnement de FoxO implique un réseau complexe de modifications post-traductionnelles et des interactions protéine-protéines qui fournissent une réponse cellulaire (85). Akt est l'une des protéines de régulation de FoxO. Lorsque FoxO1 est phosphorylé par Akt, celui-ci devient séquestré dans le cytoplasme par la protéine de séquestration 14-3-3, inhibant son retour au noyau comme facteur de transcription. De plus, cette phosphorylation vient changer sa conformation du site de liaison à l'ADN (86). Cette inhibition permet la survie, la croissance et la prolifération cellulaire (39). Les protéines FoxO nécessitent une localisation nucléaire pour accomplir leur fonction de facteurs de transcription.

FOXO1 serait un régulateur important pour la réceptivité utérine *in vivo*. En effet, une expérience sur des souris femelles mutées PGR -Cre/FoxO1 (*FoxO1 KO mice*) accouplée avec des mâles WT, mène à la létalité embryonnaire, due à l'altération de la polarité des cellules épithéliales lors de l'invasion embryonnaire (87, 88). En d'autres

termes, le blastocyste ne s'attache pas complètement à l'épithélium endométriale, menant à l'infertilité de la femelle. L'ablation de Foxo1 amène une augmentation de la voie de signalisation de la progestérone, cela serait causé par la rétention de l'expression de PGR dans l'épithélium utérin lors de la fenêtre d'implantation. L'activation constitutive de PGR pendant cette période inhiberait l'expression de FoxO1 dans le noyau des cellules épithéliales utérines (88). En effet, la progestérone exerce son effet inhibiteur de la prolifération via FoxO1 ainsi que plusieurs protéines régissant la prolifération et le cycle cellulaire. FoxO1 semble nécessaire pour l'initiation de l'apoptose à la suite de la diminution de l'influence de la progestérone. Cette diminution serait importante pour la détérioration de la couche fonctionnelle de l'endomètre (menstruation) (89). FoxO serait impliqué lors du cycle reproduction, de l'implantation embryonnaire et pour la décidualisation (90).

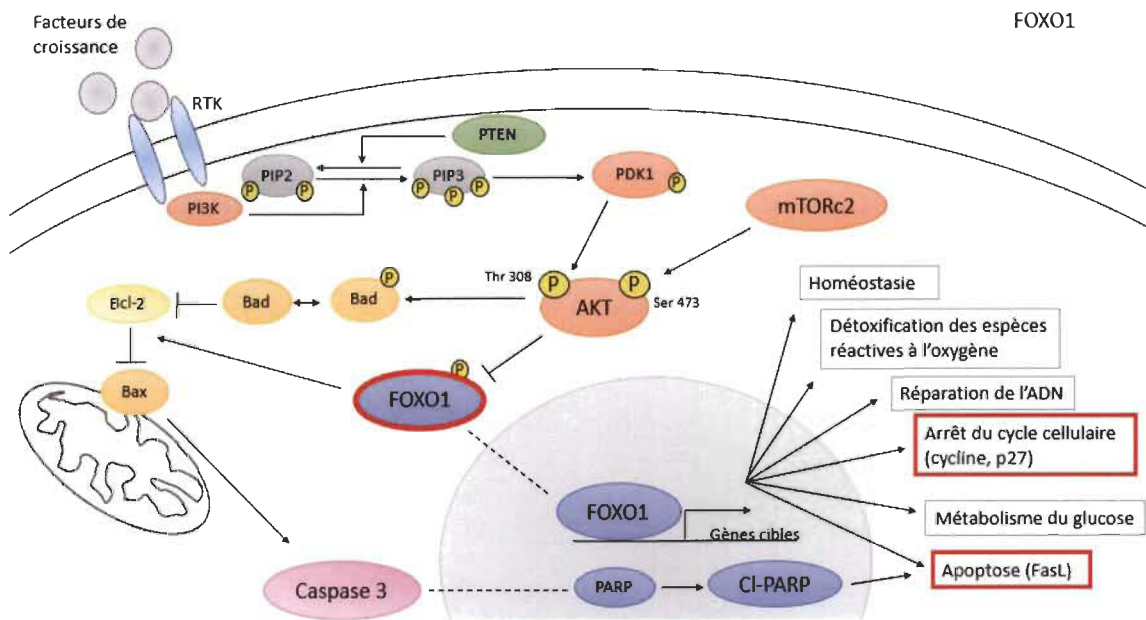


Figure 1.14 Voie de signalisation de FoxO1 (figure du laboratoire du Dr Asselin). La protéine Akt inhibe FoxO1 en le phosphorylant. Avec ce changement de conformation, FoxO1 ne peut se lier à l'ADN et agir comme facteur de transcription.

1.7 Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire permet aux cellules de se multiplier rapidement et en grande quantité. Ce phénomène est important lors du développement embryonnaire, de son implantation et du cycle reproducteur. Lors du cycle utérin, les modifications hormonales permettent soit la prolifération cellulaire ou l'apoptose. La prolifération cellulaire est activée par plusieurs voies de signalisation, dont celle de PI3K/Akt (48).

1.7.1 C-jun

Cette protéine est un proto-oncogène nucléaire qui peut être activé par plusieurs stimuli tels que l'œstrogène, des cytokines et du stress cellulaire (91-93). Il y a trois types de jun dans cette famille de proto-oncogène JNK (*jun N-terminal kinase*); c-jun, jun-B et jun-D. Ils forment des homodimères ou des hétérodimères entre eux ou avec la famille fos (pour former AP-1 (*activator protein 1*)) (94). C-jun phosphorylé, c'est-à-dire activé, peut interagir avec c-Fos pour former un complexe activateur (AP-1) qui peut se lier au promoteur ou à l'activateur de nombreux gènes (95) (Figure 1.15). L'œstrogène peut venir activer jun en interagissant directement avec AP-1, permettant un contrôle transcriptionnel des cibles géniques de jun et fos. L'œstrogène permet la régulation transcriptionnelle de protéines nécessaire à la croissance, la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose. C-jun joue un rôle pour la progression dans le cycle cellulaire lors du cycle reproducteur (96, 97).

Dans l'utérus, c-jun est régulé par l'œstrogène. En effet, l'œstrogène permet l'expression de c-jun au niveau des cellules épithéliales utérines, suggérant que c-jun est directement impliqué dans la phase proliférative (98), plus particulièrement pour la croissance des glandes endométriales (99). Lors de la gestation, les niveaux d'œstrogène sont à la baisse, diminuant directement c-jun, démontrant une relation entre les deux molécules (100).

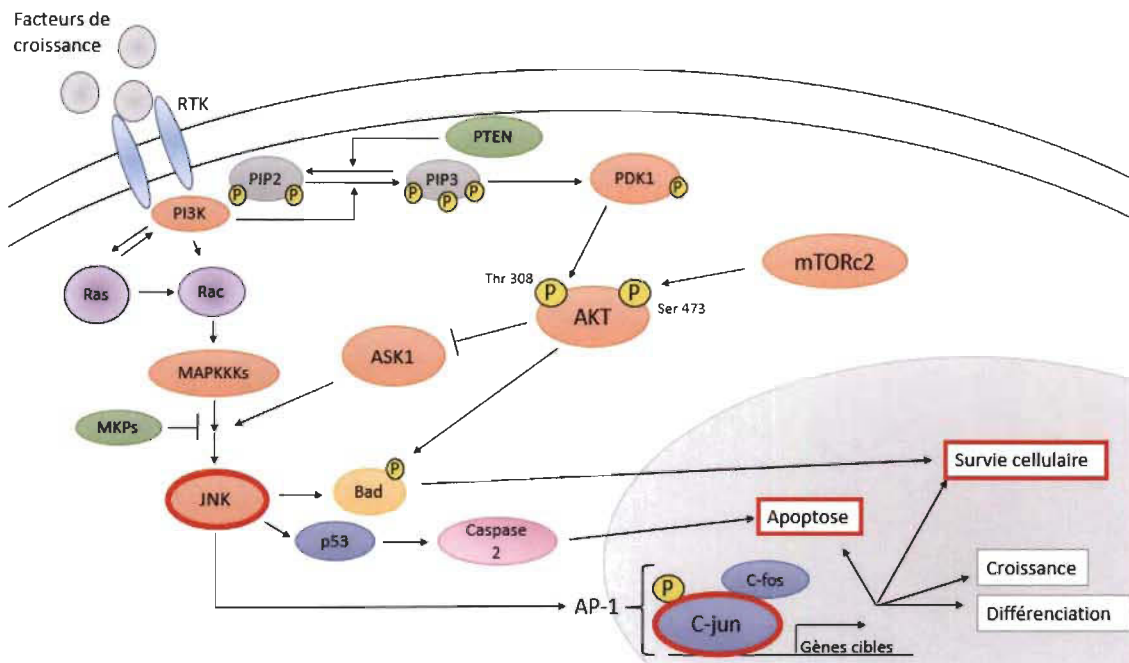


Figure 1.15 Voie de signalisation JNK (figure du laboratoire du Dr Asselin).
Akt vient inhiber ASK1, inhibant ainsi l'activation de la voie JNK. Cela empêche la formation d'AP-1 et ainsi favorisé la transcription de gènes pour la survie cellulaire et l'apoptose.

1.7.2 MTor

Les protéines mTor sont des kinases sérine/thréonine qui appartiennent à la famille des PI3K (101). Elles permettent la régulation de la synthèse de protéines. Celles-ci reçoivent des signaux qui répondent à des facteurs de croissance pour coordonner la croissance, la prolifération et l'homéostasie (102). Elles perçoivent diverses informations provenant de l'environnement comme la concentration de nutriments et d'énergie (103). Il en existe deux types, mTor complexe 1 et mTor complexe 2. MTorC1 est phosphorylé par Akt lorsque celle-ci est activé par des facteurs de croissance, tandis que mTorC2 phosphoryle Akt (101). MTorC2 est nécessaire pour plusieurs kinases, dont Akt, pour que celles-ci soient pleinement actives (104). Elles ont des fonctions similaires, dont le métabolisme et les facteurs de croissance cellulaire (Figure 1.16).

Cependant, elles diffèrent au niveau de leur spécificité au niveau de leurs substrats, de leurs fonctions et de leur sensibilité aux drogues (49, 104). En effet, mTorC1 a un rôle

dans la synthèse protéique, en activant S6K1 (*ribosomal protein S6 kinase 1*). En plus de cette activité, il permet la biogenèse des lysosomes, des mitochondries, ainsi que le métabolisme des lipides (101). La présence suffisante d'acides aminés est nécessaire à l'activation complète mTORC1, assurant ainsi la synthèse protéique (105). Alors que mTORC2 a des rôles dans la survie cellulaire (facteur de croissance) et de l'organisation du cytosquelette (Figure 1.16) (103, 106).

Au niveau de la reproduction, cette voie de signalisation est nécessaire pour la croissance des cellules de l'endomètre induite par l'œstrogène (Figure 1.17). En effet, un dysfonctionnement de mTor conduit à l'infertilité féminine causée par des problèmes de fonctions ovariennes et endométriales (107, 108). La signalisation mTorC2 est essentielle à la survie folliculaire et au développement de l'endomètre (109) (Figure 1.16).

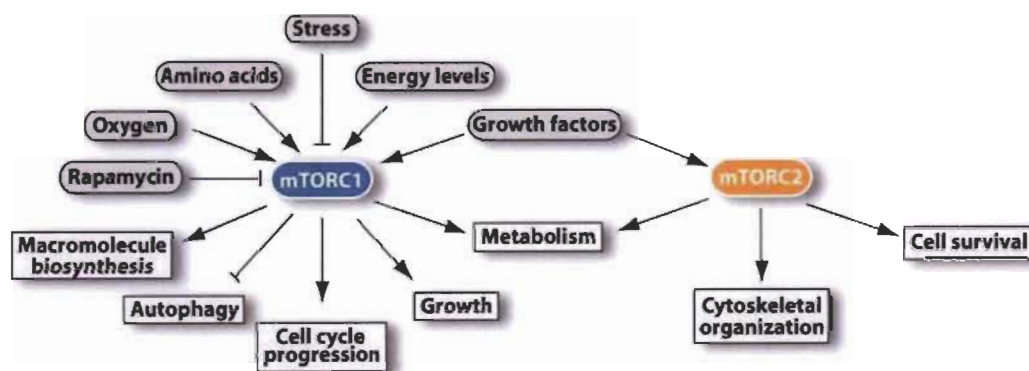


Figure 1.16 Fonctions de mTOR (103).

Il existe des similitudes entre mTorC1 et mTorC2, telles que le métabolisme et les facteurs de croissance. Cependant, chaque mTor a aussi des rôles spécifiques.

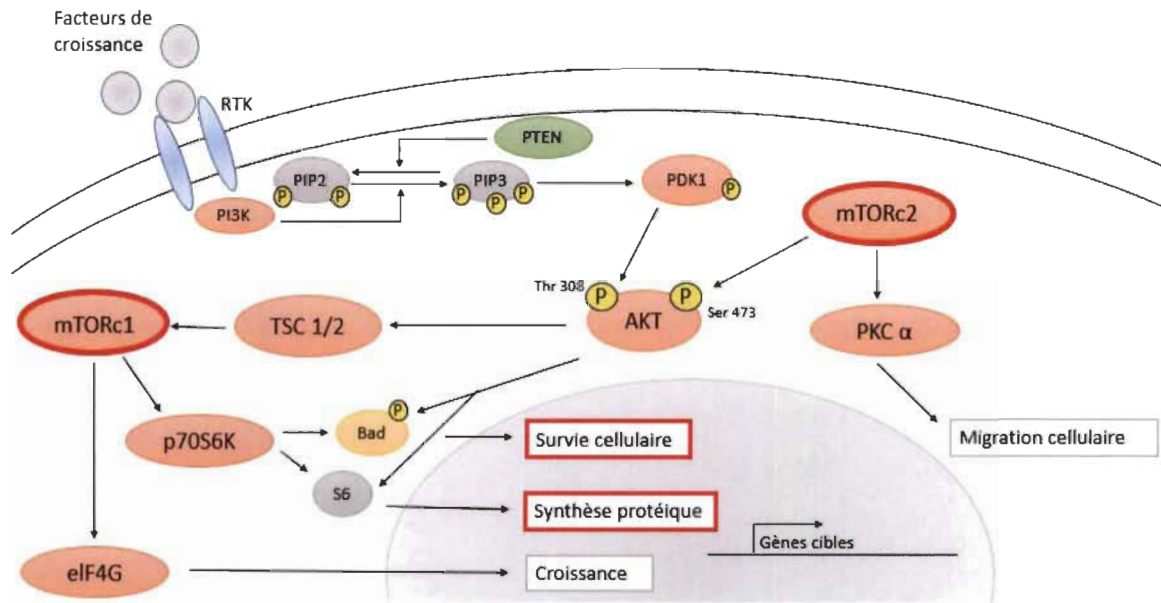


Figure 1.17 Voie de signalisation de mTOR (figure du laboratoire du Dr Asselin). Akt permet l'activation de mTorC1 en activant TSC1/2. Cette activation permet finalement la survie cellulaire et la synthèse de protéine ainsi que la croissance cellulaire.

1.7.3 PCNA

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) est une protéine eucaryote qui est au centre de la réplication. Elle est vitale, comme cofacteur pour les ADN polymérases lors de la réplication dans tous les organismes eucaryotes. En effet, elle active directement les activités enzymatiques au niveau de l'ADN et de la chromatine. Elle permet aussi la réparation de l'ADN lors de recombinaisons homologues ou d'excisions, par exemple (110). Sa présence signifie que la réplication de l'ADN est en court. Alors elle est fréquemment utilisée pour analyser la prolifération dans un tissu grâce à un anticorps monoclonal spécifique.

1.8 Modèle animal

Le modèle animal utilisé est celui de la souris. En effet, comme décrit plus haut dans le texte, cet animal présente de nombreux avantages dont sa taille, facilitant ainsi sa manipulation, et son court cycle œstral. Les souris C57BL/6 ont été mutées génétiquement

pour supprimer les gènes d'Akt (1-2-3) en utilisant le système PGR-Cre-LoxP. Cela permet la délétion des gènes aux endroits où le récepteur à la progestérone est exprimé. Ces souris sans isoformes d'Akt au niveau des organes sexuels ont été fournies par le Dr Franco DeMayo (Baylor College of Medicine). Les souris KO/Akt3 ont été obtenus par le Dr M. Birnbaum de l'Université de Pennsylvanie. Toutes les combinaisons de délétions des trois gènes d'Akt (1-2-3) ont été faites par le laboratoire d'Eric Asselin (AKT1^{flox/flox}; AKT2^{flox/flox}; AKT3-KO; AKT1^{flox/flox} + AKT2^{flox/flox}; AKT1^{flox/flox} + AKT3-KO; AKT2^{flox/flox} + AKT3-KO; AKT1^{flox/flox} + AKT2^{flox/flox} + AKT3-KO). Ainsi, au cours des années, les souris sont devenues KO constitutifs homozygotes pour les deux allèles d'Akt (Figure 1.18).

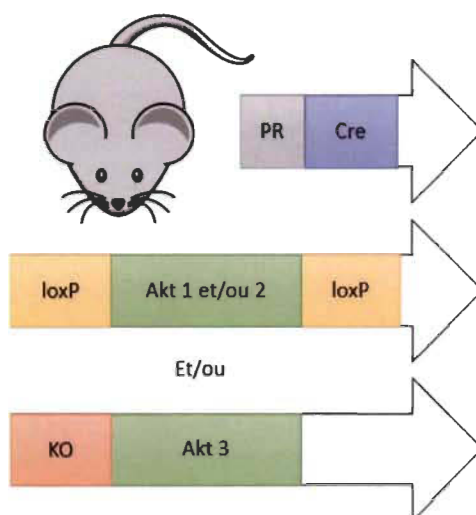


Figure 1.18 Nos souris transgéniques Cre-LoxP ou KO (figure du laboratoire du Dr Asselin).

La Cre recombinase est activé lorsque qu'il y a l'expression du récepteur à la progestérone. Ainsi, cette recombinase vient couper le gène (Akt1 ou Akt2) situé entre les deux sites LoxP. Au niveau de l'Akt3, l'ablation du gène est complète en utilisant un knock-out avec un vecteur pour le gène d'Akt3.

Il était important que les souris aient une délétion seulement au niveau des organes sexuels, car un manque d'une des isoformes peut mener à divers problèmes de santé comme le diabète de type II (*III*). Les souris ont été modifiées hors de notre laboratoire, mais il est primordial de comprendre les systèmes knock-out et Cre-LoxP.

Pour les souris knock-out Akt3, il a fallu créer un vecteur pour le gène cible, en utilisant un marqueur de sélection. Ce dernier permet de cibler les cellules contenant le vecteur. Il faut utiliser aussi un marqueur de sélection négatif, ce qui permet d'assurer que le vecteur s'est inséré au bon endroit et dans le bon sens dans l'ADN. Les vecteurs sont insérés dans des cellules souches embryonnaires (ES cells). Lors de l'insertion, il doit avoir une recombinaison homologue, mais cela ne se produit pas dans toutes les cellules. Le marqueur de sélection permet de sélectionner les cellules ayant le vecteur. Par la suite, ces cellules sont injectées dans l'embryon d'une souris. Après la naissance, il faut faire des croisements avec d'autres souris ayant subi ce processus afin d'arriver à une souris homozygote KO pour le gène cible. Ce knock-out n'est pas tissu spécifique, contrairement au processus Cre-LoxP.

Pour le système Cre-LoxP, le processus de croisement est le même, il faut utiliser une souris exprimant le gène Cre dans ses cellules et une autre souris ayant le gène cible entre deux sites LoxP (Figure 1.19). Le processus de recombinaison s'effectue lors de l'accouplement. Cre est une recombinase venant du bactériophage P1. Elle crée une recombinaison dans la séquence d'ADN, en reconnaissant les deux sites LoxP et catalysent la recombinaison entre ces deux sites. LoxP est un locus de « X-cross over » qui vient lui aussi du bactériophage P1. Il est constitué de 34 paires de bases dont la partie centrale (reconnue par Cre) est faite de 8 paires de bases non palindromiques. La recombinaison faite par Cre-LoxP excise la séquence d'ADN située entre les deux sites LoxP. Ce principe permet la délétion de cet ADN cible (112).

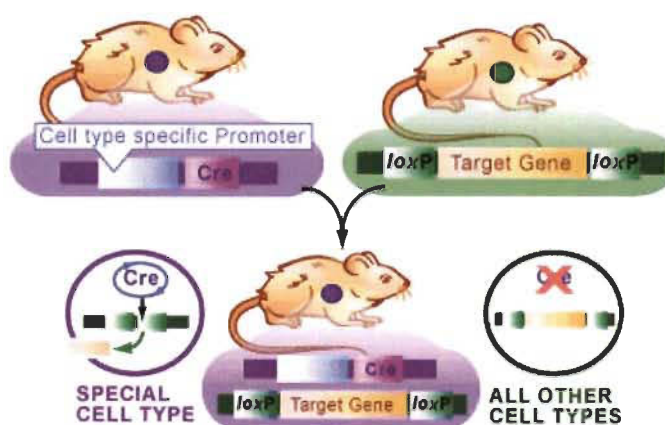


Figure 1.19 Système Cre-LoxP (112).

Le croisement entre deux souris, l'une contenant la recombinaise Cre sous le promoteur d'un gène spécifique (ici PGR) et l'autre contenant le gène cible (ici Akt1 ou Akt2) entre deux sites LoxP. À la suite de ce croisement, la souris résultante aura une délétion du gène cible dans les cellules exprimant le récepteur à la progestérone, car la recombinaise Cre serait activée. Alors que dans les autres cellules, la Cre recombinaise ne sera pas activée.

La vérification du modèle a été effectuée par immunobuvardage de type Western Blot et par immunofluorescence (IF). Cela a permis d'analyser les trois isoformes dans les KO. Les Western Blot démontrent une diminution notable d'Akt1 et d'Akt2 (Fig. 1 – Chapitre II). Cette diminution n'est pas totale comme pour l'isoforme Akt3, car le système Cre-LoxP n'est activé que dans les cellules exprimant le PGR. Or, ce n'est pas toutes les cellules utérines qui expriment ce récepteur. Cela est démontré à la figure 3.1B, où il y a présence de cellules au niveau de l'épithélium luminal et au niveau du stroma qui n'expriment pas le récepteur à la progestérone. En effet, dans l'utérus, il y a présence de cellules immunitaires telles que les « *natural killer* », de macrophages ainsi que de cellules vasculaires. Ces types cellulaires n'ont pas de PGR, ce qui amène une limitante à notre modèle.

Nous savons que le récepteur à la progestérone est exprimé dans plusieurs tissus, tels que le cœur, les muscles et les tissus adipeux entre autres (113). Par contre, l'expression de ce récepteur n'est pas présente en aussi grande quantité que dans les tissus sexuels (114). Ainsi, ce système est très efficace même avec une faible expression d'Akt dans les KO.

1.9 Hypothèse/Objectif

Lors de la préparation de l'utérus à l'implantation embryonnaire, il y a concurrence entre les facteurs d'apoptose et de prolifération cellulaire orchestrée par la voie PI3K/Akt. Cette voie permet d'activer une multitude de molécules importantes pour le processus reproductif murin (64, 115). Cependant, le rôle spécifique de chaque isoforme d'Akt lors du processus ovarien est peu connu. Le but est d'identifier la fonction spécifique de chaque isoforme d'Akt dans l'utérus aux différents stades du cycle ovarien chez la souris C57BL/6 transgénique. L'hypothèse est qu'un problème de régulation de ces isoformes (Akt1, Akt2, Akt3) pourrait être la cause d'infertilité ou autres pathologies utérines.

Les objectifs de cette étude ont été comparés les souris KO Akt1, Akt2, Akt3, Akt1-2, Akt1-3, Akt2-3 et Akt1-2-3, avec les souris WT, la fertilité, la morphologie cellulaire de l'endomètre et des glandes endométriales chez les souris C57BL/6 transgéniques PGR-cre/Akt pour l'ensemble des combinaisons KO. Par la suite, une caractérisation de différentes protéines en aval de la voie PI3K/Akt a été faite, pour analyser une compensation possible entre les isoformes d'Akt.

Pour effectuer cette recherche, il a fallu utiliser des souris transgéniques C57BL/6 PGR-cre pour les différentes isoformes d'Akt (KO Akt1/Akt2/Akt3/Akt1-2/Akt1-3/Akt2-3/Akt1-2-3) (112). D'abord, l'analyse de la fertilité via la quantité de souriceaux par portée des souris transgéniques a été analysée pour confirmer l'importance de cette recherche. Ensuite, les utérus ont été récoltés à différents moments du cycle œstral (proestrus-œstrus-metestrus-diestrus). Des immunobuvardages de type Western Blot à partir de raclage utérin de souris WT ont été analysés pour voir la modification d'expression des isoformes d'Akt au cours du cycle reproducteur. Ensuite, des coupes utérines ont été analysées avec une coloration hématoxyline et éosine (H&E) (Figure 1.20). Ainsi, l'épaisseur du stroma, la quantité et la taille des glandes endométriales ont pu être mesurées avec l'aide d'Image J. Pour bien identifier les glandes endométriales dans nos coupes utérines, des immunohistochimies avec l'anticorps FoxA2 spécifiques aux glandes ont été effectuées. Cette protéine est essentielle pour la différenciation et le développement des glandes. Elle est exprimée spécifiquement au

niveau des glandes endométriales dans l'utérus néonatal et celui de l'adulte chez les souris (116). Finalement, certaines protéines en aval d'Akt, liées à l'apoptose et la prolifération cellulaire ont été analysées par immunohistochimie telle que c-jun, mtor, PCNA, Foxo1, entre autres.

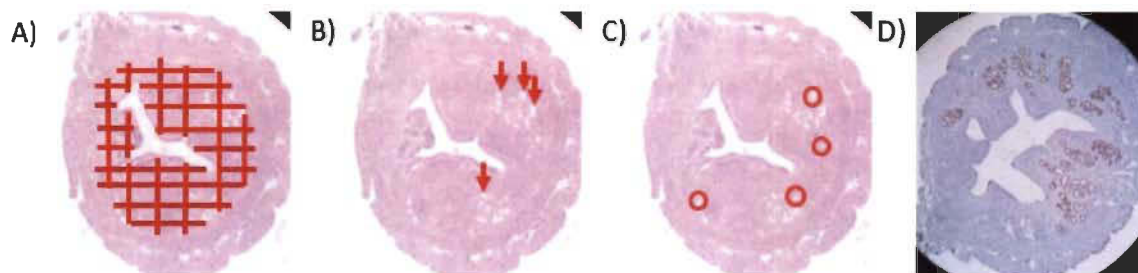


Figure 1.20 Analyse des coupes utérines murines (photos du laboratoire du Dr Asselin).

A) Analyse de l'épaisseur (la surface) du stroma (zone hachurée rouge).
 B) Analyse de la quantité de glandes endométriales (flèches rouges).
 C) Analyses de la taille des glandes endométriales (ronds rouges). A-B-C sont des coupes utérines colorées avec de l'hématoxyline et éosine.
 D) Validation de la présence des glandes utérines (couleur brunâtre) avec l'anticorps FoxA2 en immunohistochimie (IHC) avec une coloration d'hématoxyline.

Les résultats suggèrent que les isoformes d'Akt ont un rôle très important pour la fertilité, en affectant la quantité de souriceaux. Selon les Western Blot effectués, Akt total varie très peu dans le cycle ovarien de la souris. Cependant, de manière isoforme spécifique, les résultats démontrent une variation de l'expression de celles-ci entre les différentes phases. Lors de l'analyse histologique des utérus grâce à la coloration H&E, les isoformes d'Akt n'ont pas de rôle dans l'épaisseur du stroma utérin. En revanche, elles affectent la quantité ainsi que la taille des glandes endométriales diminuant ainsi les chances de nidification de l'embryon. Finalement, les analyses d'immunohistochimies ont permis de démontrer une variation de l'activation des protéines en aval d'Akt entre les différents génotypes et les phases du cycle. Cela démontre qu'il y a une redondance de fonction entre les isoformes, mais aussi que chacune a des fonctions spécifiques.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'**une préparation** à une soumission pour un journal anglophone.

2.1 Contribution des auteurs

La conception des expériences : Laurence Tardif, Pascal Adam, Sophie Parent et Eric Asselin. Les expériences ont été effectuées par Laurence Tardif, Dadou Lokengo. Les analyses de données ont été faites par Laurence Tardif. Les réactifs/matériaux/outils d'analyse ont été fournis par Eric Asselin et Monique Cadrin. Les personnes qui ont participé à l'écriture de l'article sont Laurence Tardif, Pascal Adam et Eric Asselin. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

2.2 Résumé de l'article

Les protéines de signalisation et de réponses cellulaires sont très importantes dans l'organisme. Elles le sont toutes aussi lors de l'implantation embryonnaire. En effet, les tissus maternels et le blastocyte doivent travailler ensemble pour réussir la gestation. Cette étape est caractérisée par la balance entre les facteurs d'apoptose et de survie cellulaire. La voie PI3K/Akt est reconnue pour jouer un rôle pour l'activation et l'inhibition de ces facteurs. L'objectif de cette recherche est de déterminer les rôles des isoformes d'Akt (Akt1-2-3) dans les processus reproductifs chez la souris. Les souris ont été euthanasiées entre 70 et 100 jours. Les utérus ont été récoltés et coupés en tranches de 6 microns. L'analyse de coupes utérines par hématoxyline et éosine ont permis de démontrer que les isoformes d'Akt n'ont pas d'effet sur la taille du stroma. Le KO Akt1-2 nous indique que ces deux isoformes ont un rôle dans la quantité de glandes endométriales

dans les quatre phases, mais aussi sur leur taille en proestrus seulement. Les Akt2-3 affectent leur taille en œstrus. Les analyses par immunohistochimie ont permis de vérifier l'activation ou non des protéines en aval d'Akt. Ainsi, la compensation entre les trois isoformes a pu être démontrée. En effet, les trois isoformes ont un rôle dans l'augmentation de la survie cellulaire au niveau de l'épithélium luminal en œstrus, lorsque nous analysons les protéines c-jun et PCNA. Ces analyses ont aussi démontré l'effet similaire entre deux isoformes (Akt1 et Akt2) qui ont pour effet d'augmenter la prolifération de l'épithélium glandulaire en œstrus, en analysant PGR, PCNA et pBad. Finalement, il a été démontré que chacune des isoformes a une fonction spécifique telle qu'Akt1 qui joue un rôle en metestrus en diminuant la prolifération de l'épithélium glandulaire, selon les analyses de mTor et FoxO1.

2.3 Article complet (anglais) : Effect of Akt1, Akt2 and Akt3 specific endometrial deletion and their combinations in the mouse uterus

Laurence Tardif, Pascal Adam, Dadou Lokengo, Sophie Parent,
Monique Cadrin, Eric Asselin

Department of Medical Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières,
Québec, Canada

Corresponding author:

Eric Asselin, Ph.D.

Département de Medical Biology

Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500

Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

Email: eric.asselin@uqtr.ca

Key words: Akt, Cre-lox, uterus, fertility, cellular signaling, mouse

Abstract

Apoptosis and cell survival regulation in the receptive uterus during implantation is important for successful recognition of pregnancy. PI3K/Akt signaling has a key role during gestation. Protein kinase Akt isoforms (1,2 or 3) are regulated differently in the endometrium during the estrous cycle and embryo implantation. However, the specific roles of these isoforms in the endometrium are still unknown. We have previously shown that Akt isoform expression during the rat estrous cycle and gestation are differently regulated. The aim of the present study was to establish the specific role of Akt isoforms in the mouse uterus using the PGR-Cre-LoxP system. The hypothesis is that a dysregulation of Akt isoforms expression could cause infertility and/or fertility-related issues. PR-Cre and specific LoxP Akt isoforms, C57BL/6 mice were mated to knocked out all three isoforms in the endometrium. All KO combinations (single, double and triple Akt KO) were performed. The results demonstrate that in absence of one or more Akt isoforms, female fertility is decreased. Akt isoform KO did not influence the size of stroma

but influenced the number of endometrial glands. In Akt1-2 KO mice, the number of endometrial glands was decreased significantly at estrus. In Akt2-3 KO mice, the number of glands was significantly increased at proestrus. The size of endometrial glands was reduced at proestrus in KO Akt1-2 mice. Finally, we analyzed downstream targets in the PI3K-Akt pathway, such as c-jun, mTor, FoxO1. The results demonstrated the redundancy of Akt isoforms in the regulation of proliferation and apoptosis during estrous cycle but also showed isoform specificity of action in the uterus.

Introduction

Over the last few years, problems of fertility and premature birth have been increasing all over the world. Female infertility has been shown to be the cause in 40% of cases and 10% are from unknown origin (2). In fact, couples wait longer before they start a family, reducing the chances to procreate (4). Several factors are involved for the successful pregnancy, whether psychological, biological or social levels (10, 11). Biologically, a perfect communication between the embryo and the maternal endometrium is crucial for a successful establishment of gestation (14, 117, 118). Embryo and maternal tissues must work together, otherwise, establishment of gestation will fail. Signaling proteins, such as protein kinase Akt, are fundamental actors to establish a perfect communication between the embryo and the mother.

Cell signaling in the endometrium is closely linked to metabolism, cell growth, cell survival and apoptosis (39). In fact, during preparation of the uterus for embryo implantation, there is an opposition between apoptosis and proliferation factors orchestrated by the PI3K/Akt pathway (64). Akt is a cytosolic serine/threonine kinase protein that exists in three isoforms, Akt1, Akt2 and Akt3. They are produced by three specific genes and have 80% structural homology. Akt is activated by phosphorylation (at threonine 308 and serine 473) which allows activation of a multitude of anti- and pro-apoptotic molecules (37, 39). Previous studies demonstrated the central role of Akt in mouse. Akt1 is required for a normal growth (50), Akt2 KO cause diabetes type II by affecting the glucose metabolism (51) and Akt3 KO mice exhibited reduced brain size due

to reduced cell size and number (52). We also know that Akt inhibitors are to treat cancer, because Akt is over activated in this pathology (119, 120). It is evident that Akt isoforms exhibit functional redundancy, as well as non-redundant physiological activities. Mice with combined deficiencies of both Akt1 and Akt2 displayed majorly impaired skin, bone and muscle development and died shortly after birth (121). Both Akt1 and Akt3 KO mice died at embryonic stage due to defects in growth as well as flawed cardiovascular and nervous system development (122). Finally, Akt2 and Akt3 deficient mice exhibited impaired glucose metabolism, reduced body mass as well as reduced testis and brain weight. Those mice were viable (54). This kinase is central to many human physiological roles in many signaling pathway, gain of function in cellular survival of Akt is linked to multiple human diseases such as cancer (123) and endometriosis (48). In reproduction, our laboratory has performed studies during gestation and pseudo-gestation in rats (64, 115) and demonstrate the importance of the Akt pathway in these reproductive processes. We demonstrate that Akt3 was the only phosphorylated isoform at the time of implantation, further the idea that specific isoform exerts tight control in specific mechanisms (64). However, the specific role of each Akt isoform during the estrus cycle and pregnancy are not known to date. We hypothesized that a dysregulation of one or more Akt isoforms could affect mice fertility. Thus, a better understanding of their specific roles, is essential to determine their involvement in female infertility.

The aim of this study was to identify the specific function of each Akt isoform in the uterus at different stages of the estrous cycle in mice. Our approach was to compare, to WT mice, cellular morphology of the endometrium and endometrial glands in the PR-cre/Akt transgenic C57BL/6 mice of all the Akt KO isoforms combinations (Akt1 KO/Akt2 KO/Akt3 KO/Akt1-2 KO/Akt1-3 KO/Akt2-3 KO/Akt1-2-3 KO).

The results suggest that Akt isoforms have a very important and different role in fertility and in the regulation of endometrial glands development. Akt isoforms KO influenced the average mouse litter number during gestation as well as the number of endometrial glands indicating that they are involved in this process. Thus, they might influence the uterus receptivity and embryo nesting, by altering the maternal-embryo communication.

Western Blot and IHC analysis of downstream Akt targets demonstrated the compensation between isoforms but also their specificity at different days of the estrous cycle.

Material and Methods

Animals and tissues

PGR-cre/+ were obtained from Dr Franco De Mayo (Baylor College of Medicine) (112). For this study, the laboratory used floxed Akt1 and Akt2 and total Akt3 KO. Mice were obtained from Dr M. Birnbaum (University of Pennsylvania). Animals were maintained on standard chow and water ad libitum with a constant 14 h light: 10 dark cycle in animal facilities. All procedures were performed in accordance with the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. All combination of Akt deletion *in vivo* were carried out (Akt1^{flox/flox}; Akt2^{flox/flox}; Akt3-KO; Akt1^{flox/flox} + Akt2^{flox/flox}; Akt1^{flox/flox} + Akt3-KO; Akt2^{flox/flox} + Akt3-KO; Akt1^{flox/flox} + Akt2^{flox/flox} + Akt3-KO).

The mice were killed at 70 to 100 days with high concentrate liquid isoflurane (Santa Cruz Animal Health). The mouse ovarian cycle last 4 to 5 days and has four phases (proestrus, estrus, metestrus and diestrus). Phase's confirmation was determined by vaginal smears colored with methylene blue (32, 124). Uteri were dissected and fixed in 4% PFA (paraformaldehyde) in PBS for 16 to 18 h. Uteri were transferred to dehydration bath (ethanol 70% - 95% - 100% and NeoClear®) for 20 min each. Finally, uteri were put in three paraffine bath.

For fertility analysis, we use minimum seven litter of female transgenic mouse. Those data were taking for two years. We observe a plug in all genotype, except Akt1-2-3 KO because this genotype always stays in metestrus.

Histological analyses

Sections of paraffines-embedded tissues (section thickness 6 μm , AO Spencer No. 820 Rotary Microtome) were stained with hematoxylin and eosin. To determine the stroma's size, number of endometrial glands and their size, the cross-sections were counted in different sections of the uterus of the same mice (n=5). Images of uterine cross-sections were taken using an Olympus IX70 microscope and Samsung Galaxy Grand Prime SM-G530W camera.

These images were used to determine stroma area with Image J software. First, to determinate the percentage occupied by the stroma (S), the total coarse section (SL) (without myometrium) and its lumina (L) were measured according to this formula. She comes form the logic of using stroma section subtracted to lumina divide by total coarse section, to calculate the percentage occupied by the stroma.

$$|(S - L/SL)| * 100 \text{ (1).}$$

Secondly, the quantity of endometrial glands for each section was calculated. Four slides for each animal with four sections per slides were used for the glands number (16 sections/mouse). Thirdly, for endometrial glands size, forty-five sections were used to estimate the percentage occupied by endometrial glands. This percentage was calculated with the size's average (G), glands' number average (N) and the stroma's size (S). It comes from the logic of using the size average multiply by glands' number divide by the stroma's size, put in percentages, to calculate the total percentage occupied by endometrial glands.

$$|(G * N)/S| * 100 \text{ (2).}$$

Immunohistochemistry

The following primary antibodies were used for immunohistochemistry: c-jun (9165; 1/300; Cell Signaling), mTor (2983; 1/100; Cell Signaling), cl-caspase 3 (9661; 1/200; Cell Signaling), cl-caspase 7 (8438; 1/200; Cell Signaling), PGR (8757; 1/1000;

Cell Signaling), PCNA (13100; 1/8000; Cell Signaling), FoxO1 (2880; 1/100; Cell Signaling), cI-PARP (94885; 1/100; Cell Signaling). The immunohistochemistry was performed using paraffin-embedded uteri tissue section (thickness 6 μ m). Slides were deparaffinized and rehydrated with dH₂O. Antigen unmasking was performed with boiling sodium citrate solution (100 mM sodium citrate, pH6, 5% Tween 20) for 30 min. Nonspecific binding was blocked with 5% normal goat serum in TBST1X for 1 hour at room temperature. Slides were then incubated with primary antibodies in 5% goat serum TBST1X overnight at 4°C. Slides were washed with TBST1X and incubated with 25 μ L Signal Stain® Boost Detection (8125; ½ with dH₂O; Cell Signaling). After, slides were incubated with Signal Stain® DAB (11725; 1 mL DAB diluent (11724) with one drop of Signal Stain® DAB Chromogen Concentrate; Cell Signaling). Slides were counterstained with hematoxylin and cover slipped.

Immunofluorescence

PGR (8757; 1/2000; Cell Signaling) antibody was used in immunofluorescence. It was performed using paraffin-embedded uterine tissue section (thickness 6 μ m). Briefly, slides were deparaffinized and rehydrated with dH₂O. Antigen unmasking was performed with a pressure and cooker and boiling citrate solution (100mM Citrate, pH6, 5% Tween 20) for 10 min. Nonspecific binding was blocked with 5% normal goat serum in TBST1X for 1 hour at room temperature. Slides were then incubated with primary antibodies in 5% goat serum TBST1X overnight at 4°C. Slides were washed and incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody (F(ab')₂-Goat anti-Rabbit IgG(H+L)-Alexa Fluor 555 #21430 1/800) for 90 min. Slides were incubated with Sudan Black B 0.1% for 60 min and finally incubated during 5 min with Hoechst solution (33342 Invitrogen H3570, 1 μ L in 2 mL de PBS).

Western Blot analysis

Using Akt KO and WT mice whole uterus, we lysed the tissue in RIPA buffer (pH 7,4 150 nM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS) containing

protease and phosphatase inhibitors (CompletedTM and PhosSTOP from Roche Applied Science). Tissue was pre-cut using scissors and sonicated for 10 sec to homogenize, then centrifuged (13000 x g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Equal amounts of protein (22 µg) were loaded in each well and then resolved by SDS-PAGE. After that, proteins were transferred using a semi-dry cell onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were blocked with 5% milk in PBS containing 0,05% Tween 20 for 1 h at room temperature, probed overnight at 4°C with primary antibody, washed three times in PBS-0,05% Tween 20 and incubated with HRP-secondary antibody (Cell Signaling) for 45 min at room temperature. Hybridized membranes were washed three times in PBS-0,05% Tween 20 and protein detection was performed by detecting peroxidase activity using SuperSignal West FemtoTM substrate (Thermo Scientific, Rockford IL), as described by the manufacturer's instruction. Signal was visualized using the Biolmaging System (UVP, CA, USA). The following primary antibodies were used for Western Blot analysis: Akt1 (75692; 1/1000; Cell Signaling), Akt2 (ab131168; 1/1000; Abcam), Akt3 (14982; 1/1000; Cell Signaling).

Statistical analysis

All the experiments were repeated on a minimum of four different mice per genotype. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 5.0; Graph Pad, San Diego, CA) followed by Tukey's test to determine the differences between the experimental groups. Differences were considered significant at the level of $p < 0.05$.

Results

Validation of the knockout mice models

Validation of the mice KO was confirmed using Western Blot and immunofluorescence analysis. Western Blot confirm a diminution of Akt1 and Akt2 in mice knockout (KO Akt1-2, KO Akt1-3 and KO Akt2-3). This diminution was not complete because the

knockout was observed only in cell expressing PGR. In figure 1, we observed that some cells in stroma and luminal epithelium did not express PGR. Those cells could be immune cells such as natural killer or vascular cells (113). We also know that PGR is expressed in many tissues such as the heart, muscles and adipocytes (125). However, this receptor expression is not present in enough quantity to alter our model. In that way, we can say that the knockout was significantly high in sexual organs without altering other organs. The Akt3 KO was total because it did not use the Cre-LoxP system, it was not sexual organ specific. The constitutive Akt3 KO doesn't affect the life of the mice only brain development (53).

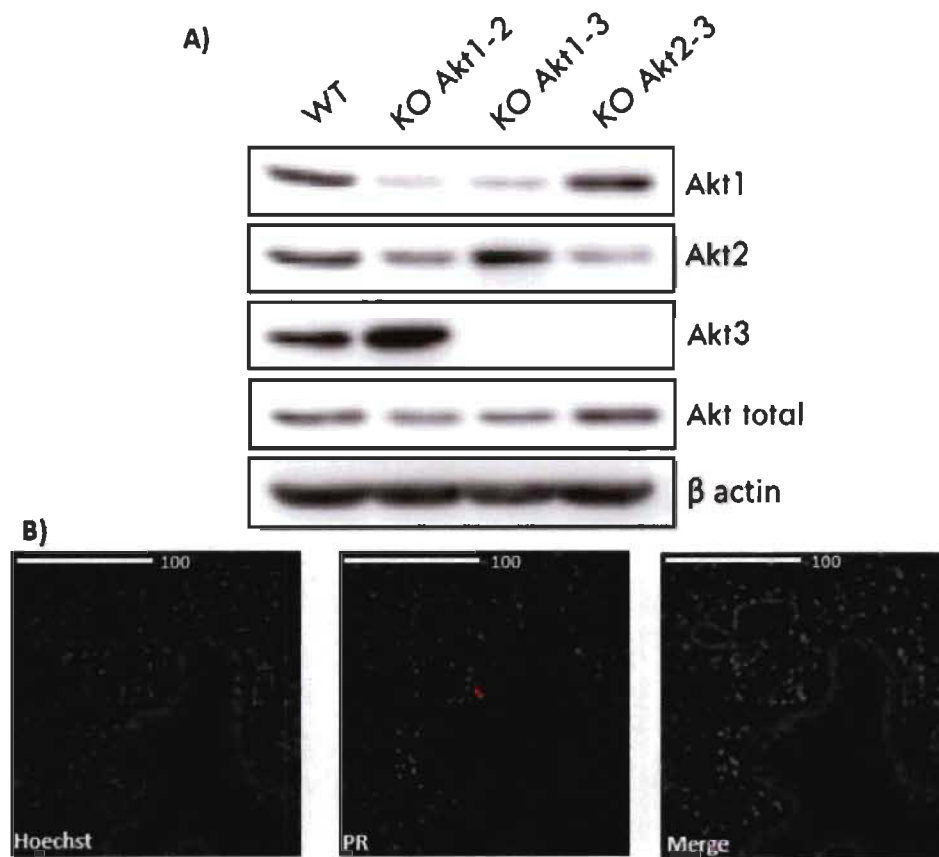


Fig. 1. Validation of KO Akt isoforms in mice uterus WT. Western Blot analysis (A) demonstrate the absence of isoform Akt1 or Akt2 or Akt3 in Akt double KO. PGR antibody uses for IF (B), we observed that receptor in red and the merge shows that some cells didn't express PGR in uterus (using an Olympus IX70 microscope 40X, Scale 100 μm)

Akt is important for female fertility

To confirm the involvement of Akt isoforms in the reproductive process, the average mouse litter number per genotype was analyzed. For Akt1-2-3 triple KO mice, mice were infertile because they always stay at metestrus (vaginal smear). We observed that there is a large variation in fertility depending of which Akt isoform is knocked out (Fig. 2). We can also notice that the variance varies according to the genotypes. For example, WT mice are the only group where all pups were alive. All genotypes have decreased fertility compared to WT (Fig. 2) In fact, KO Akt2 decreased significantly compared to WT ($p < 0.05$) (Fig. 2). It is the same for KO Akt3 ($p < 0.00001$), for KO Akt1-3 ($p < 0.0001$) and for KO Akt2-3 ($p < 0.001$) (Fig. 2) which significantly decrease. Genotypes who have 0 baby, is a female who has a plug after intercourse but 0 baby at the delivery.

Some genotypes show a fertility decrease compared to other genotypes, such as PR-cre/Akt1 and PR-cre/Akt3 ($p < 0.0001$). We can observe that Akt3 has its first quartile at value 0 and which is also its lowest value. This is the genotype that had the most litters without baby. Decreases observed in the fertility of the eight genotypes (Fig. 2) confirm that it would be interesting to go further.

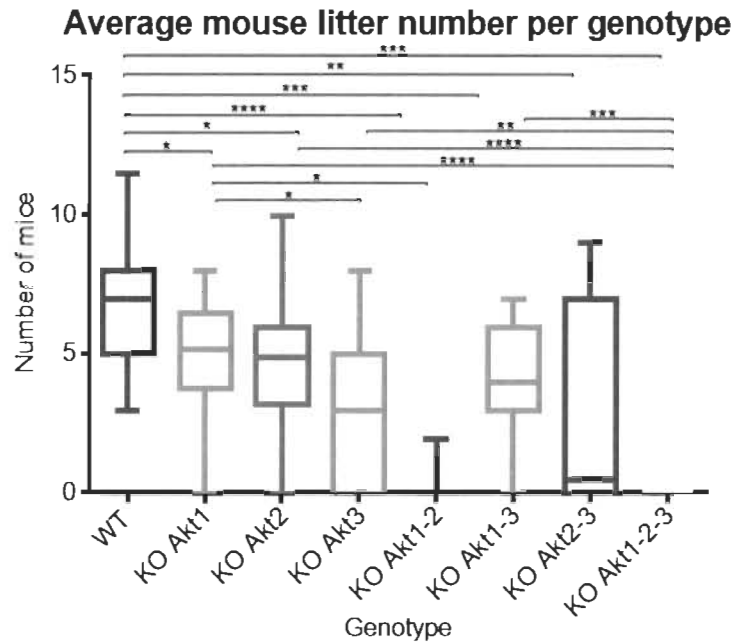


Fig. 2. Female fertility in mouse for all Akt isoform genotypes. Minimum of seven litter were used. The whiskers show Tukey test. The box is the quartile, Q1, Q3 and the median. The ANOVA and Tuckey statistical tests were performed with $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$; $p < 0.0001 = ****$.

Akt does not influence the size of the uterine stroma

The figure 3 showed uterus sections of three genotypes in estrous cycle. We can observe that the stroma size did not vary during the cycle and between the genotype, as showed in graphic at the figure 4. In the figure 3, we can observe the difference between three genotypes for the number of endometrial glands, and their size. In Akt1-2 KO mice, there less endometrial glands in all phases then WT and Akt2-3 Ko mice. In WT mice, the endometrium is proliferating in proestrus. In estrus, there's more endometrial glands to be prepared to a future implantation. In metestrus, the endometrium is inflamed because of the apoptosis of some cells. Finally, in diestrus, it's the end of the cycle, the endometrium still inflamed because of presence of natural killer cell (NK cell) (35). In the figure 3, we can observe the difference between three genotypes for the number of endometrial glands, and their size. This is what we use to do the graphic in figure 4.

For all phases, there was no significant change in stroma thickness caused by Akt knock-out (Fig. 4). On the other hand, there are some increases such as KO Akt2-3 and WT in diestrus (Fig. 4C) or decreases such as KO Akt1-2 and WT in estrus and metestrus (Fig. 4A). At estrus (Fig. 4A), the ratio distribution is not very dispersed as the boxes vary by 20% (Fig. 4A). Data in metestrus, diestrus and proestrus are more dispersed in the same genotype (Fig. 4B-C-D). There is a variance of 25-30%.

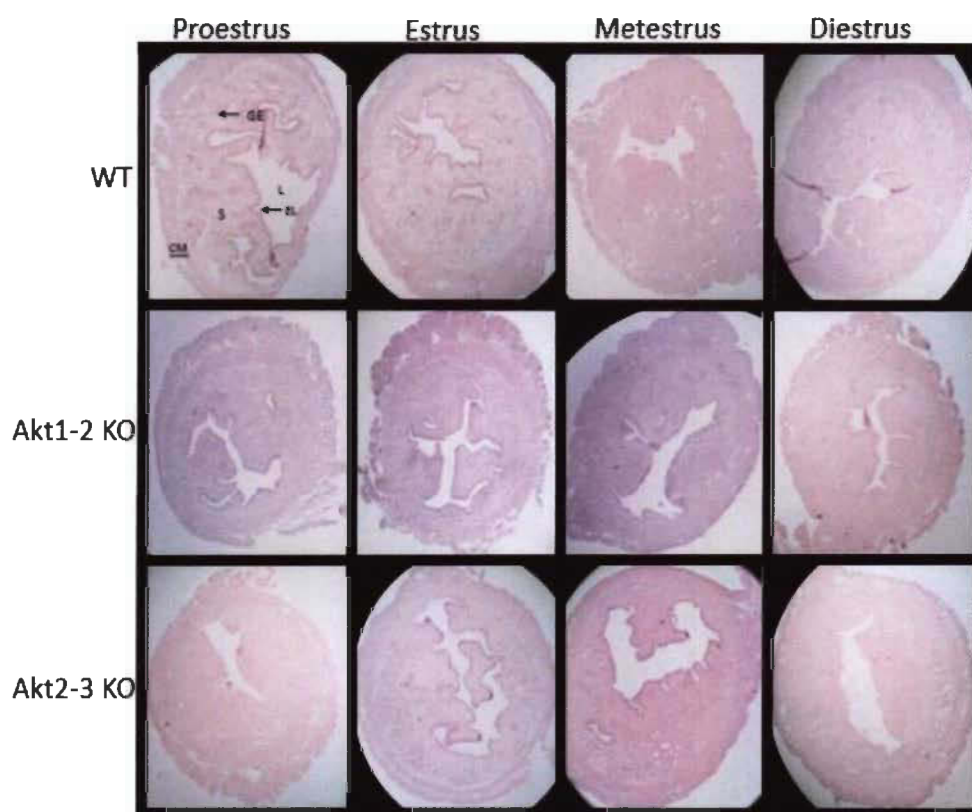


Fig. 3. Hematoxylin and eosin staining of mice uterus. This figure shows example of Akt KO mice uterus. We observe that the size of stroma didn't change in KO mice. We observe the decreased of number of endometrial glands in Akt1-2 KO in all estrous phases and the percentage occupied by endometrial glands decreased in proestrus. For Akt2-3 KO mice, the number of endometrial glands changes only in estrus. Legend: GE; endometrial glands, EL; luminal epithelium, L; lumen, S; stroma, CM; muscle.

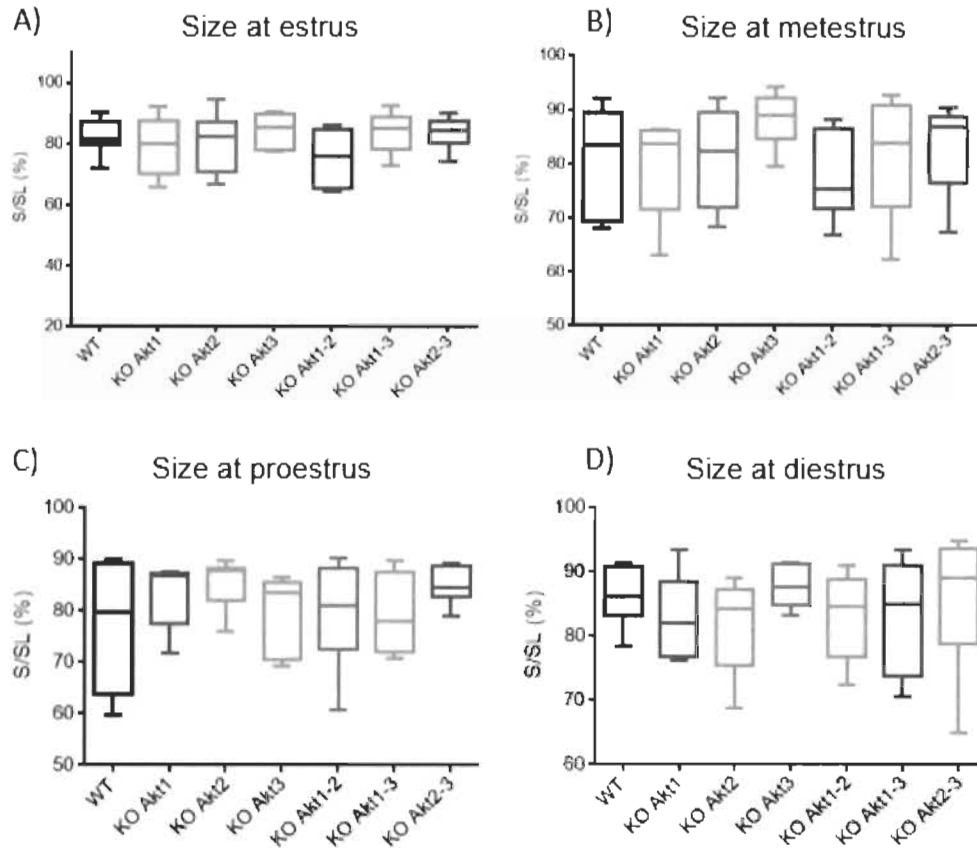
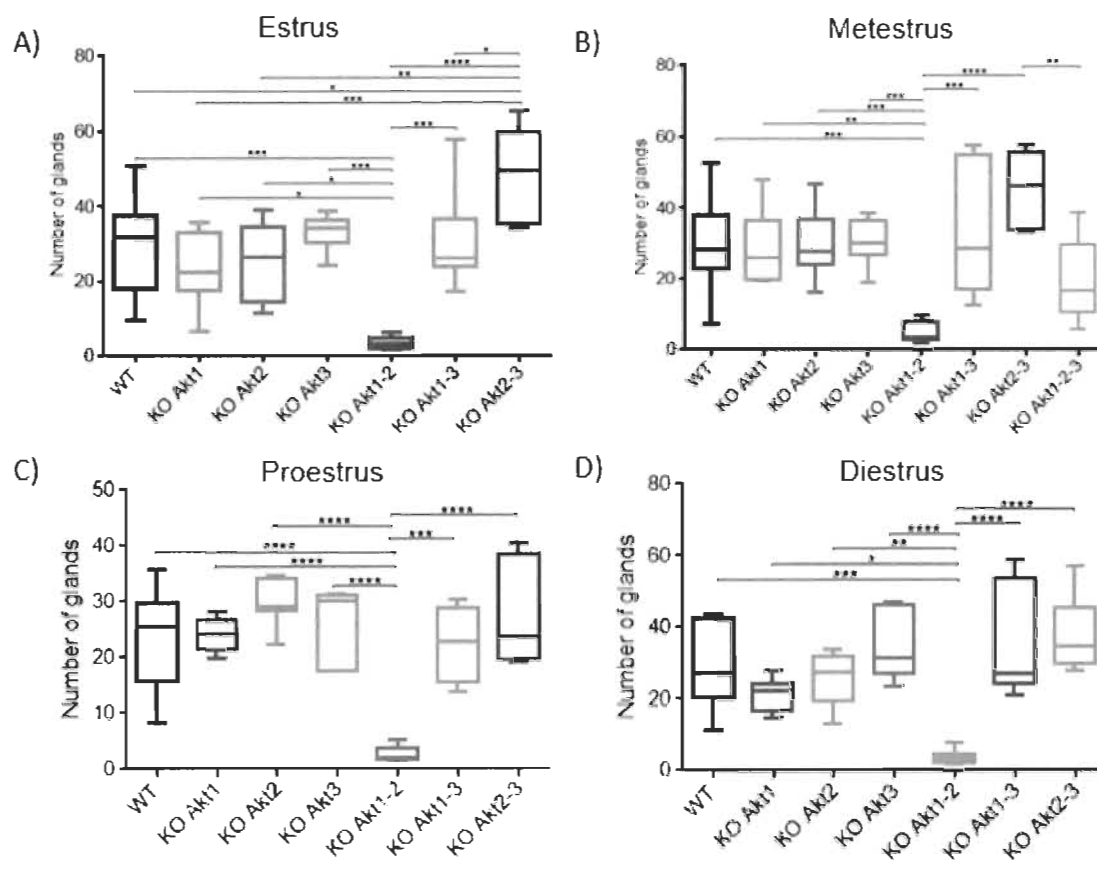


Fig. 4. Percentage occupied by uterine stroma. A) for estrus, B) for metestrus, C) for proestrus and D) for diestrus. The ratio was calculated by measuring, with Image J, the size of the stroma including the light (SL) and stroma (S) only ((S/SL) *100 (1)). The ANOVA and Tukey's statistical tests were performed with $p < 0.05$.

Akt plays a role on endometrial glands development

The analysis of the endometrial glands number demonstrates that there are several significant differences between genotypes, in all phases of estrus cycle (Fig. 5). In estrus, KO Akt1-2 decreases the number of glands compared to WT ($p < 0.001$) (Fig. 5A). Whereas KO Akt2-3 increases them compared to WT ($p < 0.05$) (Fig. 5A). Some genotypes are affected compared to WT but are not significant (as for KO Akt1, Akt2 and Akt3) (Fig. 5A). In metestrus (Fig. 5B), KO Akt1-2 decreased compared to all the other genotypes ($p < 0.01$). In proestrus and diestrus, again, KO Akt1-2 decreased the quantity of endometrial glands compared to WT and all genotypes ($p < 0.05$) (Fig. 5C-D). In fact, we can see that KO Akt1-2 decreased significantly the quantity of glands during all the different phase of the estrus cycle in mice.

We know that the number of endometrial glands vary. However, we did not know if their size changes from one genotype to another. We calculated the percentage of endometrial gland occupancy in the uterine stroma. The distribution of genotypes in estrus don't vary a lot, between 3% to 9% (Fig. 5E). In metestrus (Fig. 5F), the distributions are bigger, there variances are between 5% to 12%. In diestrus, KO AKt1-2 decreased significantly compared to KO Akt3, Akt1-3 and KO Akt2-3 ($p < 0.05$). There is variation of distribution between genotypes, such KO Akt1-2 (small) and KO AKt3 (bigger variation) (Fig. 5G). Finally, in proestrus, KO Akt1-2 decreased significantly compared to WT ($p < 0.001$), KO Akt2 ($p < 0.0001$) and KO Akt2-3 ($p < 0.01$). In fact, KO Akt1-2 decreased the endometrial gland size in proestrus only (Fig. 5H).



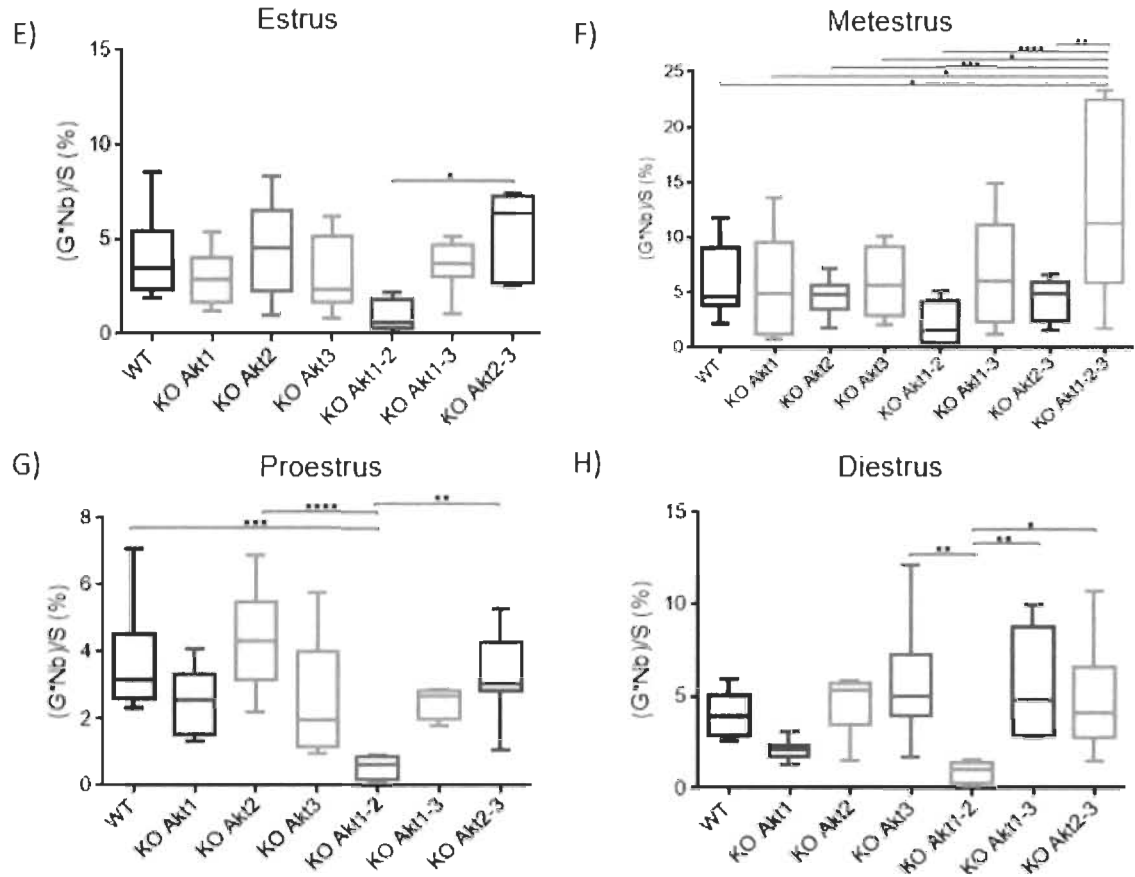


Fig. 5. Endometrial glands analyzes for all Akt genotypes. A, B, C, D represents the number of endometrial glands in estrus, metestrus, diestrus and proestrus respectively. E, F, G, H represent the total percentage of the area occupied by these glands for estrus, metestrus, proestrus, diestrus respectively. The percentage was calculated with the average of number of glands (Nb), the average of their size (G) and the stroma size (S): $((G \cdot Nb) / S) \cdot 100$ (2). ANOVA and Tuckey tests were performed with $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$.

Downstream target of Akt

In order to demonstrate Akt isoform activity, we analyze downstream target of AKT, such as mTor, c-jun, Foxo1, cl-caspase 3 and 7 and cl-PARP (Fig. 6A). We score the signal intensity (o to xxxx) of IHC for each protein (Fig. 7). We observe that there is a redundancy in their function, such as the absence of apoptosis in the stroma in proestrus (cl-casp3,7 and cl-PARP). There is also a redundancy in two isotype such as KO Akt1 and Akt2, that decreased PGR in stroma during proestrus. The results also showed that each

Akt isoforms have specific functions such as the glandular proliferation in proestrus and metestrus in Akt2 KO mice.

These results are directly linked to the H&E analysis. In fact, the mouse litter number decreased in all genotypes but has a bigger effect in KO Akt1-2. In this study, we demonstrated that this genotype affected the quantity and size of endometrial glands. During the analysis of IHC, we observe a decrease of cellular proliferation such as c-jun, PCNA, PGR, ER α in estrus, metestrus and proestrus in glands epithelium. We also observe an increase of apoptosis protein such as cl-casp3, 7 in all phases. In the same way, some proliferation factor such as c-jun and PGR was decreased during proestrus in size glands. Finally, we observe an increase of cellular proliferation factor in KO Akt2-3 in estrus such as c-jun, mtor and ER α . All this analysis shows effect in mice fertility. It's could be a direct correlation with the diminution of number of endometrial glands and their size.

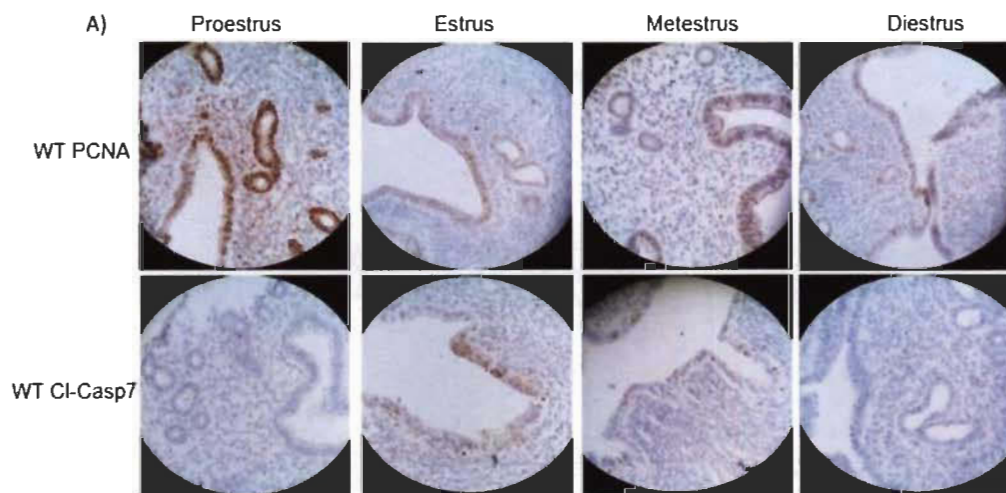


Fig. 6. IHC analysis, example. Signal in WT uterus for PCNA and cl-casp7 antibody.

A)

Proestrus	Stroma	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	xx	xx	xxx	x	xx	x	xxx	xxx
mTor	o	o	o	o	o	o	o	o
PCNA	xxx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xxx
p-Bad	o	o	o	o	o	o	o	o
Foxo1	xx	o	o	xx	o	o	o	o
ci-casp3	o	o	o	o	o	o	o	o
ci-casp7	o	o	o	o	o	o	o	o
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xx	xxx	xx	xxx	x	xxx	xxx	xxx
PGR	x	o	o	x	o	o	o	o

Proestrus	Luminal	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	xx	x	xx	x	x	x	x	xx
mTor	xx	xxx	xx	x	xxx	xx	xx	xx
PCNA	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx
p-Bad	xxx	xxx	xx	xx	x	xx	xx	xx
Foxo1	xxx	xx	xx	xx	xx	x	xxx	xxx
ci-casp3	xx	xx	xxx	xx	xxx	o	o	o
ci-casp7	xx	xx	xx	xx	xx	x	x	x
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx
PGR	xx	x	o	x	o	o	o	x

Proestrus	Glandes	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	xx	x	xxx	o	x	o	xx	xx
mTor	xx	xx	x	xx	xx	x	xx	xx
PCNA	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx
p-Bad	xx	x	x	x	xx	xx	x	x
Foxo1	xx	x	xx	xx	xx	o	xx	xx
ci-casp3	o	o	o	o	x	o	o	o
ci-casp7	x	xx	o	xx	x	x	o	o
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
PGR	xx	x	o	x	x	o	o	o

B)

Estrus	Stroma	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	x	xx	xx	xx	xx	xx	xxx	xxx
mTor	x	o	o	o	x	o	o	o
PCNA	xx	xx	xx	x	xxx	xxx	xxx	xxx
p-Bad	o	o	o	o	o	o	o	o
Foxo1	xxx	xx	xx	x	xx	xx	xxx	xxx
ci-casp3	o	o	o	o	o	o	o	o
ci-casp7	o	x	o	xx	x	o	o	o
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
PGR	xx	xx	x	x	x	xx	xx	xx

Estrus	Luminal	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	xx	xx	xx	xx	xx	x	x	xx
mTor	xx	xx	xx	xx	xxx	xxx	xxx	xx
PCNA	xx	xx	xxx	xxx	x	x	xxx	xxx
p-Bad	xx	xxx	xx	xx	xxx	xx	xx	xx
Foxo1	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
ci-casp3	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx	xx
ci-casp7	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
ci-PARP	o	x	x	x	o	xx	x	x
Era	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
PGR	xxx	xx	xx	xx	xx	x	xx	xx

Estrus	Glandes	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	x	xx	xx	x	xx	x	x	xx
mTor	x	x	x	xx	xx	xx	xx	xx
PCNA	xxx	xx	xx	xxx	xxx	x	x	xxx
p-Bad	xx	xxx	xx	x	xx	x	x	x
Foxo1	xx	xx	xx	xx	xxx	xxx	xx	xx
ci-casp3	o	x	o	x	o	o	o	o
ci-casp7	o	x	x	xx	x	o	x	x
ci-PARP	o	o	o	x	o	o	o	o
Era	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
PGR	xxx	xx	xx	xx	xx	x	xx	xxx

C)

Metestrus	Stroma	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	xx	x	xx	x	xxx	xx	x	xx
mTor	o	o	o	o	o	o	o	o
PCNA	xxx	xx	xxx	xxx	x	xx	xxx	xxx
p-Bad	o	o	o	o	o	o	o	o
Foxo1	o	xx	o	x	x	xx	x	x
ci-casp3	x	o	o	x	o	x	o	o
ci-casp7	o	xx	xx	o	x	o	o	o
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	x	xxx
PGR	xx	x	xx	x	x	xx	o	o

Metestrus	Luminal	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	x	o	x	x	x	x	o	o
mTor	x	xx	xx	x	xx	xx	xx	xx
PCNA	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
p-Bad	xx	xx	xx	xx	xxx	xx	xx	xx
Foxo1	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
ci-casp3	xxx	xx	xxx	xx	x	xx	xxx	xxx
ci-casp7	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	o	xx	xx
ci-PARP	xx	o	x	o	x	o	x	x
Era	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xx	xxx
PGR	xx	x	x	x	xxx	xx	x	x

Metestrus	Glandes	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	x	x	x	x	xx	x	x	x
mTor	x	xx	xx	x	x	xx	xx	xx
PCNA	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
p-Bad	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Foxo1	x	xx	xx	xx	xx	xx	xx	x
ci-casp3	x	x	x	x	o	x	o	o
ci-casp7	o	xx	x	x	x	o	o	o
ci-PARP	xxx	o	o	o	o	o	o	o
Era	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
PGR	xxx	x	xx	x	xxx	xxx	x	x

D)

Diestrus	Stroma	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	x	xx	x	xx	xx	x	xx	xx
mTor	o	o	o	o	o	o	o	o
PCNA	xxx	xxx	xxx	x	xxx	xxx	xxx	xxx
p-Bad	o	o	o	o	o	o	o	o
Foxo1	x	o	x	x	x	xx	x	x
ci-casp3	o	o	o	o	o	o	o	o
ci-casp7	o	o	o	x	o	x	o	o
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx
PGR	x	x	x	x	x	xx	x	x

Diestrus	Luminal	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	o	x	o	x	o	o	o	o
mTor	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
PCNA	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
p-Bad	o	xx	o	x	o	o	o	x
Foxo1	xxx	xxx	xx	xx	xx	xx	x	xx
ci-casp3	o	x	xx	x	xx	x	xx	xxx
ci-casp7	x	xxx	x	xx	xxx	x	xxx	xxx
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	x	xxx
PGR	xx	x	xx	xx	xx	xx	xx	xx

Diestrus	Glandes	WT	KO Akt1	KO Akt2	KO Akt3	KO Akt1-2	KO Akt1-3	KO Akt2-3
c-jun	o	x	o	o	o	o	o	o
mTor	x	xxx	x	x	x	xx	xx	x
PCNA	xx	xx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx
p-Bad	o	xx	o	o	o	o	o	x
Foxo1	xxx	xx	xx	xx	xx	xx	o	x
ci-casp3	o	x	x	o	x	o	o	o
ci-casp7	o	xx	o	x	o	o	o	x
ci-PARP	o	o	o	o	o	o	o	o
Era	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
PGR	xx	x	x	x	x	xx	x	xx

Fig. 7. IHC analysis of downstream targets of Akt in stroma cells, epithelium cells and glandular epithelium cells. A) Proestrus B) Estrus C) Metestrus and D) Diestrus. Signal: o; none, x; very low, xx; low, xxx; medium, xxxx; high.

Discussion

Gestation is orchestrated by several signals from maternal tissues and embryos. This communication is essential for a successful pregnancy. Cell survival and apoptosis factors come into play during this communication. The PI3K/Akt signaling pathway has been extensively studied in fertility because it allows for this balance between apoptotic and cell survival factors (64). These factors are very important for good implantation preparation (126). In this present study, specific role of each Akt isoform in reproductive processes has been investigated using PGR-cre C57BL/6 transgenic mice. It was important to have loss expression only in sex organs, as studies have shown that Akt knockout mice can lead to mortality or several developmental problems (50-52). Using these transgenic mice, we were able to analyze fertility, size of uterine stroma and endometrial glands development during mouse estrous cycle.

Our study established that Akt has an important role in mice fertility. We have shown that there are significant decreases in the number of mice pups between genotypes (Fig. 1). This means that Akt isoform have a role in the estrous cycle (as for KO Akt1-2-3 which always remains in metestrus) or during the implantation or even during embryo survival. These results follow our hypothesis of the central role of Akt in reproduction process. Another study demonstrated that Akt is strongly expressed in the stromal cell of the implantation site (118) and that Akt has a role in the dynamic process of decidualization (127). Our results confirmed the importance of Akt in mice uterus for uterine receptivity and a role in the regulation of glandular epithelial cells as demonstrated in previous studies (63, 128). Our data demonstrate evidence for overlapping actions of Akt isoform during estrous cycle as demonstrated in previous study who suggesting that Akt1 and Akt3 posses a similar function in implantation processes (54). This effect is reinforced by the fact that Akt1 and Akt3 Ko mice were embryonically lethal because of the improper placenta vasculature (121). Our results showed that each Akt isoform is express in estrous cycle as demonstrate in previous study in our lab (64).

We know that uterine stroma proliferates to promote implantation (129). According to our results, Akt isoforms would not significantly affect the uterine stroma (Fig. 2).

This protein could be not involved in maturation of the uterine stroma during estrous cycle. Another possibility is that other factor unknown for now could have the same function as Akt for a possible function redundancy. A study demonstrated that Wtn6 protein is involved in stroma proliferation during decidualization (130). It could be possible that this protein affected the stroma during estrous cycle too. Another study has shown IGF-1 increased at proestrus phase, mediated by estrogen via autocrine and paracrine signalisation (131). Finally, another study using rat stroma cells, demonstrated that TNF- α and EGF increased the proliferation activity in stromal cells in culture (132). All those proteins could have a proliferation activity, such as Akt.

Finally, we know that endometrial glands have a role in uterine receptivity, implantation and decidualization (30). The glands endometrial secretions must be present for a good receptivity during the implantation window which is a crucial moment (133, 134). A study has already been conducted on a PUGKO mouse model (uterine glands knockout) (135, 136). This study demonstrated that in absence of endometrial glands and their secretions, blastocysts can attach to maternal tissues, but they are unable to survive (135). Another study demonstrated the same result, that inhibition by gene mutation or treatment (such as progestins) the development of uterine glands results in infertility (137). Knowing their importance, we analyzed the impact of Akt deletion on the endometrial glands. Data suggest that Akt isoforms are important for uterine glands development. There an evidence that this infertility is multifactorial is that Akt3 is less fertile then WT, but stroma and endometrial glands is normal. That could be explain by the fact that the KO could affect ovaries or implantation site. Our laboratory is going to study this impact too.

Leukemia inhibitory factor (LIF) is a multi-functional cytokine protein that exerts different functions in different tissues or cells. LIF is activated by LIF binding to LIF receptor complex composed of LIF receptor (LIF-R) and glycoprotein gp130, which activates selective signaling pathway such as JAK/STAT3, PI3K/Akt, MAPK and/or ERK1/2 pathway (Fig. 8) (138). Embryonic blastocyst cells, endometrial epithelial and stromal cells, ovarian granulosa-theca are known to produce LIF. LIF is transcript by TGF- β , tumor necrosis factor (TNF- α) and epidermal growth factor (EGF) (139). LIF KO

mice produced normal embryo, but they did not success to implant in the uterus (140). A study has already been conducted on (LIF) demonstrate that this protein, secreted from the endometrial glands, is essential for rendering the uterus receptive for blastocyst implantation (134, 141). In our case, even if LIF is secreted by endometrial glands, but Akt is absent or deficient, it could influence the secretions and therefore the establishment of uterus receptivity. It could be the reason of the decrease in fertility of Akt KO mice we demonstrate in figure 3.

Conclusion

This study identified the specific function of each Akt isoform during the reproductive process in mice. It confirmed their involvement in female fertility and demonstrated that this protein is important for endometrial glands development. Indeed, the results suggest that Akt isoform have a role in the ovarian cycle as demonstrated by KO Akt1-2-3 genotype which is still in metestrus and the decrease in fertility (Fig. 1). In addition, they would be important for the number of endometrial glands (Fig. 3A-B). Akt1 and 2 isoforms would be important for increasing the uterine glands size in all phases (Fig. 3). In fact, the function of Akt change during the estrus cycle and depend of this localization in uterus. For course, this study is not all completed. Your laboratory study the absence of Akt isoform impact on ovaries (ovulation and hormones), implantation sites and gestation to know exactly what cause infertility in this model. This study is a start for further investigation, we think that mouse infertility is multifactorial. Thus, future studies can be performed in decidualization, implantation and parturition, always in transgenic mice. More IHC could be performed to analyze more critic genes for endometrial glands such as Lef1 and Wnt. Women's biopsies can be analyzed to confirm dysregulation of Akt isoforms in fertility problem. Assisted Human Reproduction aims to help women with problems to conceive. On the other hand, if the problem is intrinsic (Akt level), this method will not help. Therefore, this research is important for a better understanding of infertility, which could avoid unnecessary suffering for women.

Declaration of interest

The authors have nothing to disclose.

Funding

This work was supported by NSERC.

Acknowledgment

We are grateful to Dr Franco De Mayo (Baylor College of Medicine) and Dr M. Birnbaum (University of Pennsylvania) for the transgenic mice. We also thanks Dr Derek Boerboom (Université de Montréal) for his help designing the mouse model.

References

1. G. d. Canada, Fertility. (2019).
2. N. M. Crawford, A. Z. Steiner, Age-related infertility. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 42, 15-25 (2015).
3. R. Sharma, K. R. Biedenharn, J. M. Fedor, A. Agarwal, Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 11, 66 (2013).
4. R. J. Hart, Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiological reviews* 96, 873-909 (2016).
5. F. van den Brule et al., Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chemical immunology and allergy* 88, 163-180 (2005).
6. T. Kajihara, J. J. Brosens, O. Ishihara, The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Medical molecular morphology* 46, 61-68 (2013).

7. L. Liu, Y. Wang, Q. Yu, The PI3K/Akt signaling pathway exerts effects on the implantation of mouse embryos by regulating the expression of RhoA. *International journal of molecular medicine* 33, 1089-1096 (2014).
8. X. Zhang, N. Tang, T. J. Hadden, A. K. Rishi, Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 1978-1986 (2011).
9. A. Veillette et al., Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biology of reproduction* 88, 79 (2013).
10. E. Gonzalez, T. E. McGraw, The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502-2508 (2009).
11. H. Cho, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, M. J. Birnbaum, Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 276, 38349-38352 (2001).
12. H. Cho et al., Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728-1731 (2001).
13. R. M. Easton et al., Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Molecular and cellular biology* 25, 1869-1878 (2005).
14. S. Faes, O. Dormond, PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *International journal of molecular sciences* 16, 21138-21152 (2015).
15. B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu, G. B. Mills, Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 4, 988-1004 (2005).
16. X. D. Peng et al., Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development* 17, 1352-1365 (2003).
17. Z. Z. Yang et al., Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and cellular biology* 25, 10407-10418 (2005).
18. B. Dummeler et al., Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology* 26, 8042-8051 (2006).

19. K. Brasseur, N. Gevry, E. Asselin, Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget* 8, 4008-4042 (2017).
20. F. Fabi, E. Asselin, Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction* 148, R85-95 (2014).
21. P. L. Caron, G. Frechette-Frigon, C. Shooner, V. Leblanc, E. Asselin, Transforming growth factor beta isoforms regulation of Akt activity and XIAP levels in rat endometrium during estrous cycle, in a model of pseudopregnancy and in cultured decidual cells. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 7, 80 (2009).
22. S. M. Soyal et al., Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis* 41, 58-66 (2005).
23. D. S. Inderdeo, D. R. Edwards, V. K. Han, R. Khokha, Temporal and spatial expression of tissue inhibitors of metalloproteinases during the natural ovulatory cycle of the mouse. *Biology of reproduction* 55, 498-508 (1996).
24. S. L. Byers, M. V. Wiles, S. L. Dunn, R. A. Taft, Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one* 7, e35538 (2012).
25. J. D. Graham, C. L. Clarke, Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews* 18, 502-519 (1997).
26. L. Tessitore et al., Adipocyte expression and circulating levels of leptin increase in both gynaecological and breast cancer patients. *International journal of oncology* 24, 1529-1535 (2004).
27. O. Tschopp et al., Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943-2954 (2005).
28. S. J. Dharma, S. D. Kholkute, T. D. Nandedkar, Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle. *Indian journal of experimental biology* 39, 218-222 (2001).
29. S. Lalitkumar et al., Polyethylene glycated leukemia inhibitory factor antagonist inhibits human blastocyst implantation and triggers apoptosis by down-regulating embryonic AKT. *Fertility and sterility* 100, 1160-1169 (2013).
30. D. Gentilini et al., PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Molecular human reproduction* 13, 317-322 (2007).

31. W. Zheng et al., Maternal phosphatidylinositol 3-kinase signalling is crucial for embryonic genome activation and preimplantation embryogenesis. *EMBO reports* 11, 890-895 (2010).
32. H. J. Chang et al., *Pik3ca* is required for mouse uterine gland development and pregnancy. *PloS one* 13, e0191433 (2018).
33. P. S. Cooke et al., Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6535-6540 (1997).
34. Q. Wang et al., *Wnt6* is essential for stromal cell proliferation during decidualization in mice. *Biology of reproduction* 88, 5 (2013).
35. B. Carlsson, H. Billig, Insulin-like growth factor-I gene expression during development and estrous cycle in the rat uterus. *Molecular and cellular endocrinology* 77, 175-180 (1991).
36. T. Gamo et al., Effects of tumor necrosis factor- α on cell proliferation, prostaglandins and matrix-metalloproteinases production in rat endometrial stromal cells cultured in vitro. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology* 307, 699-707 (2007).
37. J. Filant, T. E. Spencer, Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *The International journal of developmental biology* 58, 107-116 (2014).
38. A. Sharma, P. Kumar, Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *Journal of human reproductive sciences* 5, 2-6 (2012).
39. J. Cheng, G. Rosario, T. V. Cohen, J. Hu, C. L. Stewart, Tissue-Specific Ablation of the LIF Receptor in the Murine Uterine Epithelium Results in Implantation Failure. *Endocrinology* 158, 1916-1928 (2017).
40. C. A. Gray, R. C. Burghardt, G. A. Johnson, F. W. Bazer, T. E. Spencer, Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 124, 289-300 (2002).
41. A. M. Kelleher, G. W. Burns, S. Behura, G. Wu, T. E. Spencer, Uterine glands impact uterine receptivity, luminal fluid homeostasis and blastocyst implantation. *Scientific reports* 6, 38078 (2016).

42. P. S. Cooke, T. E. Spencer, F. F. Bartol, K. Hayashi, Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Molecular human reproduction* 19, 547-558 (2013).
43. X. Li et al., LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget* 5, 788-801 (2014).
44. L. M. Senturk, A. Arici, Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 39, 144-151 (1998).
45. C. L. Stewart et al., Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79 (1992).
46. H. Bhatt, L. J. Brunet, C. L. Stewart, Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 11408-11412 (1991).
47. Igenomix, ERA® Endometrial Receptivity Analysis.

CHAPITRE III

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

3.1 Discussion

L'infertilité féminine touche de plus en plus de femmes partout dans le monde. Plusieurs raisons peuvent mener à ce problème. En effet, les femmes retardent leur première grossesse, tout en sachant que la fertilité diminue avec l'âge (4). De plus, l'environnement social, par exemple des lacunes dans la qualité des soins dépendamment du seuil de pauvreté; les facteurs génétiques, tels que le gène BRCA (*breast cancer gene*) qui cause une diminution de la réserve ovarienne, une diminution de la quantité de follicules primordiaux et des ovocytes en endommageant l'ADN (142, 143); ainsi que des problèmes de santé tels que des traitements pour le cancer qui sont de plus en plus courants, peuvent causer une diminution de la fertilité féminine (6). La plupart du temps, une mauvaise communication entre l'embryon et l'endomètre de la mère cause ces problèmes (21). Il doit avoir une balance entre les facteurs apoptotiques et les facteurs de survie cellulaire. Des solutions médicales sont parfois offertes aux femmes aux prises avec des problèmes d'infertilité, tels que l'insémination artificielle ou la fécondation *in vitro* (FIV) (15). Si ces solutions ne sont d'aucune aide, les problèmes peuvent être au niveau de voie de signalisation moléculaire.

Une des voies de signalisation principale contrôlant l'apoptose et la survie cellulaire est la voie PI3K/Akt. En effet, il a été démontré qu'elle est impliquée dans un bon nombre de maladies, telles que le cancer et l'endométriose. Cette voie permet aussi la prolifération cellulaire, le métabolisme du glucose et la synthèse de protéines (48, 64). C'est pour cette raison qu'elle est souvent mutée dans les pathologies, car son impact est immense. Des recherches ont été menées pour connaître le rôle des isoformes dans le métabolisme. Cela a permis de démontrer la spécificité des isoformes d'Akt. Par exemple, nous savons qu'Akt1 a un rôle central dans le métabolisme, car en son absence, il y a une augmentation

de la mort néonatale et une diminution de la masse du corps (50). Pour Akt2, il est important dans le métabolisme du glucose. Les souris KO Akt2 développent un diabète de type 2 (51). Finalement, Akt3 serait impliqué dans le développement du cerveau (52, 53). Ces études démontrent que les isoformes d'Akt ont un rôle dans les processus cellulaires. Elles soutiennent aussi l'intérêt d'étudier chaque isoforme, car elles pourraient jouer un rôle différent lors des processus reproductifs féminins.

Dans la reproduction, nous savons qu'Akt est impliquée à divers moments lors de la gestation et que l'expression de ses trois isoformes varie (64, 144, 145). Cependant, les rôles spécifiques des isoformes d'Akt dans les processus reproductifs ne sont présentement pas connus. L'hypothèse de cette recherche est qu'une ou plusieurs isoformes d'Akt-joueraient un rôle dans la fertilité féminine. En effet, nous pensons qu'une mauvaise régulation des isoformes d'Akt pourrait mener à l'infertilité ou à d'autres maladies utérines.

Pour les expériences, nous avons utilisé le modèle animal de la souris. En effet, le cycle œstral de la souris est similaire à au cycle menstruel de la femme. Dans les deux cas, ils sont affectés par les hormones de la FSH, la LH, l'œstrogène et la progestérone. Des souris transgéniques PGR-cre/Akt ont été utilisées. Toutes les combinaisons de délétions possibles ont été faites (AKT1flox/flox; AKT2flox/flox; AKT3-KO; AKT1flox/flox + AKT2flox/flox; AKT1flox/flox + AKT3-KO; AKT2flox/flox + AKT3-KO; AKT1flox/flox + AKT2flox/flox + AKT3-KO). Ce modèle permet d'avoir des souris viables n'ayant pas certaines isoformes d'Akt dans leurs organes sexuels. Le court cycle œstral (4-5 jours) est un grand avantage de ce modèle. Les échantillons d'utérus récoltés à l'âge de 70 à 100 jours ont permis d'effectuer diverses analyses histologiques et de Western Blot.

Nos souris sont modifiées génétiquement pour avoir une absence de Akt dans les organes sexuels, en utilisant le système PGR-cre. Nous savons que le récepteur PGR régule l'implantation embryonnaire et le développement des glandes, des effets qui sont capitaux dans la fertilité féminine (146). Nous savons aussi que la progestérone a un effet

dans plusieurs autres organes tels que le cerveau, les os et le cœur (113). Des expériences ont déjà été menées sur les tissus adipeux démontrant que les adipocytes sécrètent des adipokines qui affecteraient la sécrétion d'hormones sexuelles (147, 148). En effet, la leptine, faisant partie des adipokines, serait impliquée dans la maturation sexuelle (125). Il a aussi été démontré qu'Akt a un rôle dans les adipocytes, mais que c'est Akt2 qui serait le plus impliqué (149-152). Cependant, selon « The Human Protein Atlas », le récepteur à la progestérone est faiblement exprimé dans les adipocytes et atteint son maximum dans les organes sexuels. De plus, selon le protocole établi pour la méthode KO via le PGR-cre, les auteurs ont fait des contrôles pour s'assurer que le knock-out était tissu spécifique aux organes sexuels. Les organes sexuels étaient les seuls à être affectés de manière significative (112). En effet, d'autres études de KO PGR-A ou KO PGR-B ont permis de démontrer que la fonction de la progestérone était majoritairement au niveau des organes sexuels. Cela a démontré que PGR-A est important pour le développement utérin et les fonctions reproductives alors que PGR-B est essentiel pour le développement normal des glandes mammaires (153, 154). Ainsi, nous pouvons s'assurer que les changements observés entre nos géotypes sont causés par le KO Akt.

Avec les analyses de Western Blot, nous avons démontré qu'Akt total varie peu au cours du cycle œstral chez la souris WT. Cependant, l'expression d'Akt1 et d'Akt3 varie pendant le cycle alors qu'Akt2 semble constant. En analysant les isoformes en un seul graphique, il est possible de voir la prédominance d'un isoforme dans chaque phase. En effet, Akt2 est plus présent en proestrus alors qu'Akt3 l'est plus en œstrus (Figure 3.1). Ces résultats suggèrent un rôle spécifique des isoformes dans le cycle œstral de la souris. Akt2 semble liée à la prolifération cellulaire, qui est présente en proestrus alors qu'Akt3 semble impliquée dans l'apoptose (présente en œstrus). Cela vient confirmer l'implication des isoformes d'Akt dans la reproduction féminine et qu'il serait intéressant de pousser plus loin les expériences. Lors de ces analyses, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux pour chaque isoforme. Ainsi, malgré l'homologie entre les isoformes, les anticorps étaient spécifiques, car nous n'avons pas observé de reconnaissance lors de la validation de nos anticorps (Figure 3.1). Le résidu de signal observé dans l'utilisation des anticorps Akt1 et Akt2 sont justifiés par la présence de cellules sans PGR dans

l'utérus. Cela signifie que ces cellules n'ont pas été affectées par le KO, et qu'il y a présence résiduelle des isoformes d'Akt. Il resterait bien sûr à faire ces analyses de Western Blot sur tous nos génotypes de souris pour ainsi confirmer les résultats obtenus dans les analyses d'IHC. Il aurait été intéressant d'utiliser un anticorps isoforme spécifique Akt en IHC pour valider notre modèle et visualiser la variation des isoformes pendant le cycle œstral de la souris. Cependant, il n'existe aucun anticorps spécifique Akt3 sur le marché qui fonctionne en IHC ou IF. C'est pour cette raison que notre validation de modèle a été effectuée par analyses Western Blot.

Dans cette analyse, nous avons mesuré la quantité totale des isoformes d'Akt, soit son expression totale. Cependant, il aurait été intéressant d'analyser la forme active, soit la phosphorylation des isoformes d'Akt. En effet, ces mesures auraient permis d'analyser la variation de l'activation des isoformes d'Akt. Cela nous aurait permis de mieux comprendre ce qui se passe pour Akt lors du cycle œstral. Il existe des anticorps spécifiques en Western Blot pour les isoformes d'Akt, mais ceux-ci ne sont pas de qualité optimale, selon les expériences que nous avons faites dans le laboratoire. Une immunoprécipitation des isoformes pAkt aurait aussi pu permettre cette mesure d'activation, avec des anticorps spécifiques.

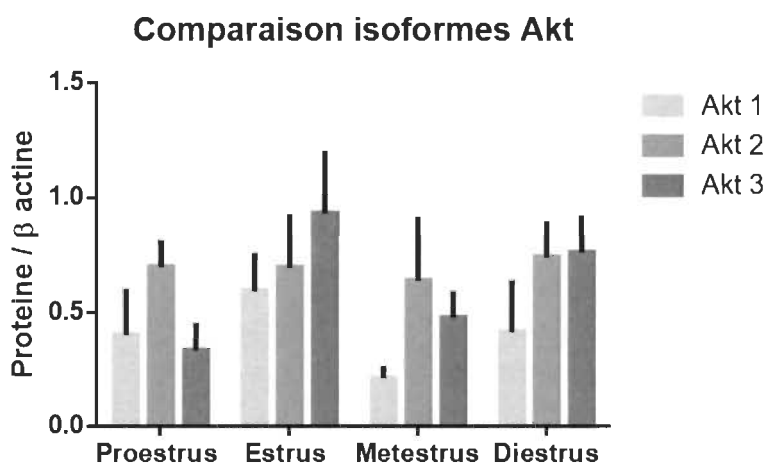


Figure 3.1 Comparaison des isoformes d'Akt dans le cycle œstral chez la souris WT.

La quantité des isoformes d'Akt varie pendant le cycle œstral de la souris. Ces changements ne sont pas significatifs avec une analyse statistique ANOVA et test Tukey avec le logiciel GraphPadPrism 6.

Une comparaison entre les génotypes KO et WT a été faite au niveau de la quantité de souriceaux obtenus lors de portée. Selon les résultats obtenus, la protéine Akt a un rôle dans la fertilité féminine chez les souris. En effet, chaque génotype amène une diminution de la quantité de souriceaux comparativement aux WT. En absence totale des isoformes d'Akt, les souris femelles sont infertiles, car elles sont toujours en metestrus. Cette phase n'est pas propice à l'accouplement avec le mâle ni pour l'ovulation, qui se passant en œstrus. Ensuite, l'analyse de coupes utérines par coloration d'hématoxyline et éosine a permis de calculer le stroma et la taille des glandes endométriales. En effet, il a été démontré que le stroma utérin prolifère pendant le cycle utérin pour favoriser l'implantation embryonnaire (129, 155). Cependant, selon les résultats obtenus, les trois isoformes d'Akt n'ont pas d'impact sur l'épaisseur du stroma. Cela pourrait s'expliquer par le fait que cette protéine n'est pas impliquée dans la maturation du stroma.

Avec les mêmes coupes utérines, nous avons mesuré la quantité et la taille des glandes endométriales. En effet, il a été démontré dans des précédentes études que les glandes endométriales sont importantes pour la réceptivité utérine, l'implantation et la décidualisation (30, 136). Cette étude a aussi démontré que l'absence de glandes endométriales chez les souris PUGKO (*progesterone-induced uterine gland knockout*), empêchait l'implantation embryonnaire (Figure 3.2) (136). Des études ont démontré que leurs sécrétions permettent en autres, une bonne réceptivité lors de la fenêtre d'implantation et la survie de du blastocytes (133-135).

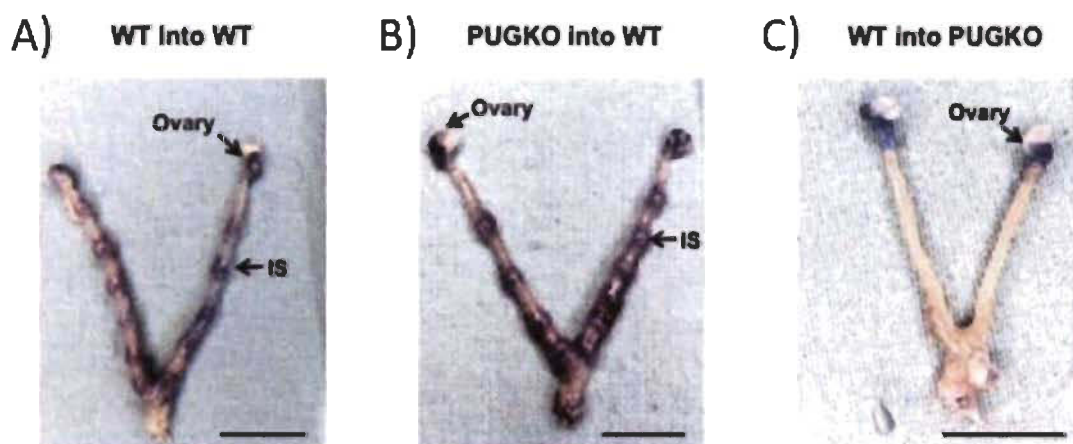


Figure 3.2 Analyses utérines des souris PUGKO.

A) Effet de l'implantation d'une souris WT dans un utérus WT.
 B) L'implantation d'une souris PUGKO dans un utérus WT.
 C) L'implantation d'une souris WT dans un utérus PUGKO. (136)

En connaissant leur importance, nous avons analysé la quantité de glandes endométriales par coloration hématoxyline/éosine ainsi que par IHC avec l'anticorps FoxA2. Les isoformes Akt1 et Akt2 permettent l'augmentation de la quantité de glandes endométriales et ce de manière significative pour toutes les phases. Ensuite, nous nous sommes demandé si la taille des glandes endométriales variait aussi. Pour rapporter les valeurs de pixels en ratio, nous avons calculé le pourcentage d'occupation total des glandes endométriales. Les résultats démontrent que la taille des glandes est affectée de manière significative par l'absence d'Akt1-2 en proestrus. En effet, les KO Akt1-2 amènent une diminution significative de la taille des glandes endométriales comparativement aux WT en proestrus. Les isoformes d'Akt, plus précisément Akt1 et Akt2, ont un rôle à jouer au niveau des glandes endométriales, comme démontré dans une précédente étude (128). Elles auraient un impact sur les sécrétions nécessaires à une bonne réceptivité utérine. En leur absence, cela causerait une diminution de la fertilité d'Akt, ce qui a été démontré dans nos résultats. Les effets des doubles KO (Akt1-2, Akt1-3 ou Akt2-3) ne semblent pas être des effets additifs, c'est-à-dire que la sommation des effets individuels d'une isoforme telle que KO Akt1 et des effets d'une autre isoforme telle que KO Akt2 n'est pas égal aux effets observés du KO Akt1-2. Ces effets seraient synergiques et non additifs.

Pour l'IHC des protéines en aval dans la voie de signalisation d'Akt, nous avons analysé des facteurs impliqués dans la prolifération et l'apoptose dans le cycle reproducteur. En effet, nous savons qu'une harmonie doit être créée entre ces deux phénomènes pour permettre une implantation embryonnaire. Des protéines ont été analysées, telles que c-jun, mTor, cl-caspase 3 et 7, cl-PARP, pBad, ER α , PGR, PCNA, FoxO, car nous savons qu'elles sont présentes dans l'épithélium luminal et glandulaire ainsi que dans les cellules stromales. La prolifération cellulaire a été analysée, car il a été démontré qu'elle est impliquée à divers moments dans la gestation et le cycle œstral (156). Cette prolifération se passe en proestrus, pour favoriser une future implantation embryonnaire chez la souris, comme démontré par nos résultats.

L'apoptose est un phénomène physiologique normal dans le système reproducteur féminin. Cette mort cellulaire serait plus présente au niveau de l'œstrus et metestrus (diminution d'œstrogène), ce qui est confirmé par nos résultats (67, 157). En effet, lors de l'analyse des IHC des anticorps cl-Casp3, 7 et cl-PARP, nous avons constaté que le signal maximum se trouvait dans la phase œstrus et metestrus, que ce soit pour le stroma, l'épithélium luminal et glandulaire. Nous savons que la famille de gènes BCL-2 est impliquée dans l'apoptose dans la transition entre le proestrus et l'œstrus. En effet, il a été démontré qu'il y a une augmentation de facteur proapoptotique à cette période, ce qui met en lien l'apoptose et cette famille de protéines. Cette augmentation de gènes BCL-2 pourrait médier le processus ovulatoire (158). Nous savons qu'Akt phosphoryle Bad au niveau de sa sérine 136 (74). C'est pour cette raison que nous avons analysé la phosphorylation de la sérine 136 et non total. Ainsi, nos résultats étaient plus précis qu'avec un anticorps pour une phosphorylation complète. Dans le stroma, il n'y a aucun signal de pBad et cl-PARP pour toutes les phases et génotypes. Au niveau de l'épithélium luminal WT, pBad est à son apogée en proestrus et n'a aucun signal en diestrus. Pour l'épithélium glandulaire, le signal est à son maximum en œstrus, metestrus et proestrus.

En résumant les résultats, les isoformes d'Akt ont une importance au niveau de la fertilité. En revanche, plusieurs facteurs sont à prendre en compte lors des analyses.

En effet, leurs rôles varient dépendamment du type cellulaire utérin dans lequel elles sont (stroma, épithélium luminal ou glandulaire), en plus de varier selon la phase du cycle œstral. La variation des niveaux de protéines des isoformes d'Akt cause des changements dans l'activation des protéines en aval de la voie de signalisation PI3K/Akt.

La panoplie de résultats obtenus a démontré que les isoformes d'Akt ont des rôles de redondance, mais aussi des rôles spécifiques à chacun. En effet, les isoformes d'Akt ne jouent aucun rôle au niveau de l'apoptose dans le stroma en proestrus et diestrus, selon les résultats d'IHC obtenus pour les protéines cl-casp3, cl-casp7 et cl-PARP. Les trois isoformes ont aussi un rôle dans l'augmentation de la prolifération cellulaire glandulaire en metestrus, selon les analyses d'IHC pour l'œstrogène et progestérone.

En plus d'avoir une redondance de fonctions entre les trois isoformes, il existe une redondance entre-deux, telles que Akt1 et Akt2 qui permettent une augmentation de la progestérone, de PCNA et pBad en œstrus dans l'épithélium glandulaire. Akt2 et Akt3 diminuent la prolifération de l'épithélium luminal en diestrus selon c-jun, PCNA, Er α et pBad. Finalement, il a aussi été démontré que les isoformes ont un rôle spécifique à chacune tel que Akt1 qui permet la diminution de l'apoptose dans l'épithélium glandulaire selon les analyses IHC de cl-casp3 et cl-casp7; Akt2 qui permet l'augmentation de la prolifération de l'épithélium glandulaire en metestrus, selon mtor, Foxo1 et PCNA; Akt3 qui permet la diminution de la prolifération des glandes endométriales en œstrus, selon l'analyse de l'œstrogène et mTor.

Il existe bien sûr d'autres cibles intéressantes pour des analyses d'IHC (Figure 3.3). Des acteurs de l'apoptose pourraient être analysés comme Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pI*), XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) et p53 (*tumor protein 53*) ainsi que de survie cellulaire telle que NF κ B (*nuclear factor κ B*). Selon une étude, les souris KO caspases 3 ont un effet variable sur l'apoptose. En effet, certaines meurent à l'état embryonnaire alors que d'autres vivent 4-5 semaines. Cela suggère d'autres facteurs impliqués dans l'apoptose tels que les IAPs (*inhibitors of apoptosis protein*) (66).

Une protéine de la famille des IAP, soit IAP3, ou mieux connu sous le nom de XIAP bloque l'activité des capases alors que les protéines Smac/DIABLO inhibe XIAP (activent l'apoptose). En effet, Smac/DIABLO est libéré par la mitochondrie dans le cytosol, permettant l'activation des caspases par liaison et neutralisation des XIAP (64). Comme Akt est au centre de plusieurs voies de signalisation, dont l'apoptose, il serait possible que XIAP régule Akt. En effet, cette hypothèse a déjà été soulevée dans des études concernant les cellules déciduales ainsi que des cellules épithéliales ovariennes (159-161). Il se pourrait donc Akt joue un rôle sur cette famille d'inhibitrice de l'apoptose dans le but de bloquer l'apoptose.

NFκB, un facteur de transcription permettant la survie cellulaire, est séquestrer par les sous-unités p65 et p50 dans le cytoplasme par les IKBs (*inositol κB*) et ces derniers sont dégradés par ubiquitination lors de l'activation NFκB par pAkt (157). Cela permet de délocalisation cellulaire de NFκB dans le noyau, pour qu'elle puisse jouer son rôle de facteurs de transcription (162). XIAP pourrait réguler la survie cellulaire en ciblant NFκB (163, 164). Il a aussi été démontré que NFκB est impliqué dans la survie des cellules endométriales lors de l'implantation embryonnaire (165). C'est pour cela que d'autres analyses de différentes protéines pourraient être utiles pour bien comprendre l'implication d'Akt et de son absence sur les voies de signalisation en aval de celle-ci.

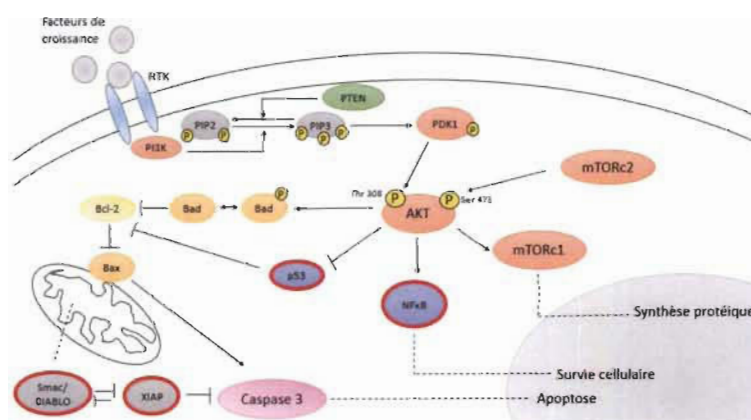


Figure 3.3 Autres cibles intéressantes pour des analyses d'IHC (figure du laboratoire du Dr Asselin).

La voie de signalisation d'Akt permet une grande activation de protéine en aval. D'autres protéines auraient été intéressantes à analyser dans cette recherche, au niveau de la survie cellulaire et de l'apoptose.

Finalement, des cibles précises pour les glandes endométriales auraient pu être analysées. LIF (*leukemia inhibitory factor*) est une cytokine multifonctionnelle qui a différentes fonctions au niveau de plusieurs tissus et cellules. LIF est activé par sa liaison au complexe composé du récepteur LIFR et de la glycoprotéine gp130, qui active la voie de signalisation Jak/STAT3 (*Janus kinase/signal transduced and activators of transcription*). Cette voie active par la suite PI3K/Akt, MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et/ou ERK1/2 (*EGF epidermal growth factor*) (Figure 3.4) (138). Les cellules du blastocyste, les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre ainsi que la granulosa de la thèque ovarienne sont connues pour produire la protéine LIF. LIF est une cytokine qui est sécrétée et active des voies de signalisation autocrine et paracrine, tels que Jak/Stat3, PI3K/Akt, ERK1/2. LIF est régulé par plusieurs molécules tels que l'œstrogène, TGF- β , EGF et TNF- α . (139, 166). Une étude a démontré que les souris LIF KO produisent des embryons normaux, mais que ces embryons ne réussissent pas à s'implanter dans l'utérus (140). Plusieurs études ont aussi démontré une augmentation de LIF, sécrétée par les glandes endométriales, lors de l'implantation embryonnaire et lors du développement embryonnaire (134, 141). Dans notre étude, même si LIF est sécrété par les glandes endométriales, mais qu'Akt est absent ou déficient, il pourrait influencer les sécrétions glandulaires et donc l'établissement de la réceptivité utérine. Cela pourrait être une raison pour la diminution de la fertilité chez les souris KO pour les isoformes d'Akt.

Il existe quelques limitations en ce qui a trait aux expériences de cette étude. En effet, les analyses d'IHC ont permis de voir la modification des protéines en aval, par la modification de la coloration du signal observé. Cependant, cette analyse n'est pas quantitative, créant une limitation. Une analyse Western Blot pourrait être effectuée pour confirmer ces modifications de manière semi-quantitative. Cela permettrait d'être plus précis dans l'analyse de nos résultats. Aussi, des immunofluorescences pourraient être pratiquées sur les coupes utérines. Cela permettrait d'avoir une meilleure idée de la localisation des protéines dans les cellules épithéliales luminales et glandulaires ainsi que stromales. Des RT-qPCR (*Real time quantitative polymerase chain reaction*) permettraient d'analyser les ARN messenger des protéines en aval d'Akt, ce qui pourrait quantifier leur expression, permettant d'être complémentaire aux expériences précédentes.

Une limitation est au niveau de l'analyse de la reproduction de nos souris. En effet, les mâles WT que nous avons utilisés pour mesurer la fécondité de nos souris peuvent avoir des variations génétiques qui pourraient diminuer leur fertilité. Ainsi, cela viendrait ajouter une variable à nos expériences. La variabilité du mâle ne peut être quantifiée dans nos expériences. En effet, ces souris viennent de « *Jackson Laboratories* ». Ces derniers nous confirment que leurs souris ont des antécédents similaires. Cependant, cela ne signifie pas qu'ils font un séquençage de leurs souris. En analysant certaines séquences après un certain nombre de portées pour voir s'il y a une possible dérive génétique. Ainsi, pour diminuer cette variabilité, il serait possible d'évaluer la qualité des spermatozoïdes par spermogramme des mâles pour ainsi connaître la qualité de nos mâles. Une autre limitation serait au niveau des femelles. En effet, l'analyse de la fertilité ne prend pas en compte la qualité des ovules. Le manque des isoformes d'Akt pourrait venir causer des problèmes sur les protéines de surface diminuant potentiellement leur fertilité. Il serait bien d'évaluer par analyse FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) l'ovule et le spermatozoïde pour connaître s'il y a des variations de protéines de surface qui peuvent jouer un rôle dans la fertilité de nos souris transgéniques.

Une autre limitation serait au niveau des données utilisées pour le graphique de la fertilité. Les données ont été prises à divers moments et cela peut mener à des fausses données, car les souris sont sensibles à leur environnement (bruits, travaux), au stress et aux saisons (31). Ainsi, au cours d'une année, leur fertilité peut varier. Nous souhaitons donc refaire cette expérience avec tous les couples transgéniques en même temps. Ainsi, cela diminuerait la variance dans l'analyse de la fécondité.

3.2 Conclusions

Les résultats de cette étude suivent la logique d'autres études qui démontrent que les trois isoformes d'Akt ont un mode d'action similaire, mais que chacun a un rôle défini dans l'organisme (37). En effet, comme cité précédemment, Akt1 aurait un impact au niveau de la croissance et survie cellulaire (50). Akt2 serait davantage impliqué dans le diabète de type II (111, 171) tandis qu'Akt3 permettrait un développement normal du cerveau (52). Ces études viennent appuyer l'hypothèse que les isoformes d'Akt sont impliquées dans différents processus cellulaires et ce à différents degrés. Avec nos données, nous venons confirmer que chaque isoforme joue un rôle dans la fertilité féminine (63).

Nos résultats sont concluants par rapport à notre hypothèse. En effet, nous avons démontré que les isoformes d'Akt ont un impact sur la fertilité féminine que ce soit en diminuant de la quantité de souriceaux pour tous les génotypes et la diminution du nombre et de la taille des glandes endométriales. En effet, Akt1 et Akt2 ont un impact sur le nombre et la taille de glandes endométriales pouvant ainsi modifier la quantité de sécrétions utérines, affectant la fertilité. De plus, l'analyse des protéines en aval a permis de démontrer une redondance de fonctions entre les trois isoformes ou deux d'entre eux, comme expliquée précédemment (Figure 3.5). Il y a aussi des fonctions spécifiques présentes pour chacun (Figure 3.4). Cela confirme notre hypothèse et démontre l'importance de la continuité des études sur Akt au niveau de la fertilité féminine.

Expression des isoformes d'Akt dans l'épithélium glandulaire			
Isoformes	↕	Cycle œstral	Protéines analysées
Akt1	Diminution	Diestrus	c-jun, mTor, ERα, pBad, cl-casp3, 7
	Diminution	Œstrus	Cl-casp3, 7, Cl-PARP
Akt2	Augmentation	Diestrus	mTor, foxO1
	Diminution	Metestrus	mTor, PCNA, foxO1
Akt3	Augmentation	Diestrus	mTor, foxO1
Akt1-2	Augmentation	Œstrus	PGR, PCNA
	Augmentation	Metestrus	Cl-Casp3, Cl-PARP
	Augmentation	Proestrus	c-jun, PGR, pBad
Akt1-3	Diminution	Diestrus	mTor, PCNA, ERα
Akt2-3	Diminution	Œstrus	c-jun, mtor, foxO1, ERα
	Augmentation	Proestrus	PCNA, PGR, pBad

Figure 3.5 Expression des isoformes d'Akt dans l'épithélium glandulaire dans l'utérus des souris transgéniques.

Ce tableau résume en grandes lignes les effets des isoformes d'Akt sur certaines protéines analysées pendant le cycle œstral de la souris. Les résultats des isoformes d'Akt dans l'épithélium glandulaire semblaient plus importants que les autres, selon les résultats obtenus en H&E et IHC.

3.3 Perspectives

Cette recherche permettra d'ouvrir la porte sur des problèmes d'infertilité au niveau de la signalisation cellulaire d'Akt. Il existe déjà des biopsies endométriales permettant l'analyse molécules de signalisation pour déterminer le moment précis de la fenêtre d'implantation embryonnaire chez les patientes (20, 22). Cependant, cette étude démontre l'importance d'analyser des molécules de signalisation au niveau des glandes endométriales et pas seulement au niveau de la fenêtre d'implantation. En effet, plusieurs études démontrent l'importance des glandes endométriales dans la fertilité. Pourtant, celles-ci ne sont pas analysées lors des biopsies. Il serait donc favorable pour la fertilité féminine d'ajouter la protéine Akt dans les analyses endométriales. Cela va permettre aux femmes de mieux comprendre leur situation face à leurs résultats d'infertilité. Ainsi, elles pourraient éviter de faire des démarches médicales douloureuses au niveau psychologique et physique pour un problème qui ne peut être réglé grâce à la procréation médicalement assistée.

Il est certain que des expériences futures doivent être menées sur ces souris KO pour bien démontrer l'impact d'Akt sur la reproduction. En revanche, sachant qu'Akt est au centre de plusieurs voies de signalisation, il serait logique de penser que l'impact sur la fertilité en son absence est multifactoriel. Pour l'instant, nous pouvons affirmer qu'Akt a un impact sur le nombre de souriceaux par portée de souris femelles transgéniques et la quantité de glandes endométriales. En effet, la quantification des hormones sexuelles, l'analyse du KO Akt sur les ovaires et les sites d'implantation vont permettre de confirmer l'effet ou les effets d'isoformes d'Akt sur la reproduction. Cela sera possible en analysant la croissance folliculaire au niveau des ovaires et l'ovulation ainsi que les sites d'implantation. C'est pour cette raison que notre laboratoire continue ses études sur les souris transgéniques KO Akt.

Ainsi, les prochaines étapes de cette recherche sont d'utiliser ces souris transgéniques pour des analyses lors de l'implantation, la décidualisation, la grossesse et lors de la parturition. Cela permettrait une vue d'ensemble sur les rôles des isoformes d'Akt au cours de la reproduction féminine. Ainsi, cela pourrait aider à déterminer certaines causes d'infertilité pour l'instant inconnues. Pour confirmer notre hypothèse, il serait intéressant d'analyser des biopsies utérines de femmes infertiles pour démontrer la dysrégulation des isoformes d'Akt. D'autres recherches pourront être faites pour trouver un moyen de contrer un manque d'isoformes d'Akt au niveau endométriale, pour ainsi favoriser la réussite de grossesse à terme via une bonne réceptivité utérine et une bonne implantation embryonnaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. T. Bushnik, J. L. Cook, A. A. Yuzpe, S. Tough, J. Collins, Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Hum Reprod* **27**, 738-746 (2012).
2. G. d. Canada, Fertility. (2019).
3. R. V. Weiss, R. Clapauch, Female infertility of endocrine origin. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* **58**, 144-152 (2014).
4. N. M. Crawford, A. Z. Steiner, Age-related infertility. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* **42**, 15-25 (2015).
5. G. Forti, C. Krausz, Clinical review 100: Evaluation and treatment of the infertile couple. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **83**, 4177-4188 (1998).
6. D. L. Olive, S. R. Lindheim, E. A. Pritts, Endometriosis and infertility: what do we do for each stage? *Current women's health reports* **3**, 389-394 (2003).
7. A. P. Sobinoff *et al.*, Scrambled and fried: cigarette smoke exposure causes antral follicle destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology* **271**, 156-167 (2013).
8. L. e. B. S. Universités de Fribourg, Embryologie humaine.
9. B. Urman, K. Yakin, Ovulatory disorders and infertility. *The Journal of reproductive medicine* **51**, 267-282 (2006).
10. R. J. Hart, Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiological reviews* **96**, 873-909 (2016).
11. R. Sharma, K. R. Biedenharn, J. M. Fedor, A. Agarwal, Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **11**, 66 (2013).
12. G. Correia-da-Silva, S. C. Bell, J. H. Pringle, N. A. Teixeira, Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta* **25**, 538-547 (2004).

13. M. Singh, P. Chaudhry, E. Asselin, Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *The Journal of endocrinology* **210**, 5-14 (2011).
14. F. van den Brule *et al.*, Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chemical immunology and allergy* **88**, 163-180 (2005).
15. O. Fertilité, C. Ovo, Ed. (Groupe Ovo, Montréal, 2014), pp. Clinique de fertilité.
16. M. Szczygiel, M. Kurpisz, Chromosomal anomalies in human gametes and pre-implantation embryos, and their potential effect on reproduction. *Andrologia* **33**, 249-265 (2001).
17. P. E. Levi Setti *et al.*, Implantation failure in assisted reproduction technology and a critical approach to treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1034**, 184-199 (2004).
18. Igenomix, ERA® Endometrial Receptivity Analysis.
19. G. Ovo, Test Adhesio. (2014).
20. S. Messaoudi *et al.*, 15 years of transcriptomic analysis on endometrial receptivity: what have we learnt? *Fertility research and practice* **5**, 9 (2019).
21. H. Achache, A. Revel, Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human reproduction update* **12**, 731-746 (2006).
22. N. Mahajan, Endometrial receptivity array: Clinical application. *Journal of human reproductive sciences* **8**, 121-129 (2015).
23. R. Bassil *et al.*, Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? *Journal of assisted reproduction and genetics* **35**, 1301-1305 (2018).
24. N. A. C. a. J. B. Reece, *Biologie*. (2007), vol. 3e édition.
25. M. H. J. a. B. J. Everitt, *Reproduction*. Pasteur (DeBoeck Université, Bruxelles, ed. 5e édition, 2001), pp. 298.
26. Y. Makanji *et al.*, Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. *Endocrine reviews* **35**, 747-794 (2014).

27. D. J. Trombly, T. K. Woodruff, K. E. Mayo, Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Seminars in reproductive medicine* **27**, 14-23 (2009).
28. J. Hempstock, T. Cindrova-Davies, E. Jauniaux, G. J. Burton, Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **2**, 58 (2004).
29. G. J. T. a. M. D. Sanner, *Principles of anatomy and physiology*. (New York, ed. 9th, 2000).
30. J. Filant, T. E. Spencer, Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *The International journal of developmental biology* **58**, 107-116 (2014).
31. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. A. T. Y. B.A. Croy, F.J. DeMayo and S.L. Adamson, Ed. (Academic Press, United States of America, 2014), pp. 808.
32. S. L. Byers, M. V. Wiles, S. L. Dunn, R. A. Taft, Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one* **7**, e35538 (2012).
33. G. A. Wood, J. E. Fata, K. L. Watson, R. Khokha, Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction* **133**, 1035-1044 (2007).
34. N. Ben-Jonathan, C. R. LaPensee, E. W. LaPensee, What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews* **29**, 1-41 (2008).
35. S. J. Dharma, S. D. Kholkute, T. D. Nandedkar, Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle. *Indian journal of experimental biology* **39**, 218-222 (2001).
36. L. M. Thorpe, H. Yuzugullu, J. J. Zhao, PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature reviews. Cancer* **15**, 7-24 (2015).
37. E. Gonzalez, T. E. McGraw, The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502-2508 (2009).

38. I. J. Gonzalez-Robayna, A. E. Falender, S. Ochsner, G. L. Firestone, J. S. Richards, Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* **14**, 1283-1300 (2000).
39. X. Zhang, N. Tang, T. J. Hadden, A. K. Rishi, Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 1978-1986 (2011).
40. B. Miao *et al.*, Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 20126-20131 (2010).
41. B. D. Manning, L. C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007).
42. M. P. Scheid, J. R. Woodgett, Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS letters* **546**, 108-112 (2003).
43. Y. Liao, M. C. Hung, Physiological regulation of Akt activity and stability. *American journal of translational research* **2**, 19-42 (2010).
44. D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101 (2005).
45. J. Yang *et al.*, Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nature structural biology* **9**, 940-944 (2002).
46. T. O. Chan, P. N. Tsichlis, PDK2: a complex tail in one Akt. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* **2001**, pe1 (2001).
47. J. Brognard, E. Sierrecki, T. Gao, A. C. Newton, PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular cell* **25**, 917-931 (2007).
48. F. Fabi, E. Asselin, Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction* **148**, R85-95 (2014).
49. A. Toker, S. Marmiroli, Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Advances in biological regulation* **55**, 28-38 (2014).

50. H. Cho, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, M. J. Birnbaum, Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* **276**, 38349-38352 (2001).
51. H. Cho *et al.*, Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* **292**, 1728-1731 (2001).
52. R. M. Easton *et al.*, Role for Akt3/protein kinase B γ in attainment of normal brain size. *Molecular and cellular biology* **25**, 1869-1878 (2005).
53. O. Tschopp *et al.*, Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943-2954 (2005).
54. B. Dummmler *et al.*, Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology* **26**, 8042-8051 (2006).
55. S. A. Santi, H. Lee, The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American Journal of Physiology* (1 MAR 2010).
56. A. M. Martelli *et al.*, The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 2168-2178 (2012).
57. M. Ebner, B. Sinkovics, M. Szczygiel, D. W. Ribeiro, I. Yudushkin, Localization of mTORC2 activity inside cells. *The Journal of cell biology* **216**, 343-353 (2017).
58. S. J. Yun *et al.*, Differential regulation of Akt/protein kinase B isoforms during cell cycle progression. *FEBS letters* **583**, 685-690 (2009).
59. M. T. Kunkel, Q. Ni, R. Y. Tsien, J. Zhang, A. C. Newton, Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. *The Journal of biological chemistry* **280**, 5581-5587 (2005).
60. V. Cenni *et al.*, Ankrd2/ARPP is a novel Akt2 specific substrate and regulates myogenic differentiation upon cellular exposure to H₂O₂. *Molecular biology of the cell* **22**, 2946-2956 (2011).
61. O. Guzeloglu Kayisli, U. A. Kayisli, G. Luleci, A. Arici, In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biology of reproduction* **71**, 714-721 (2004).

62. A. Toyofuku *et al.*, Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod* **21**, 1122-1128 (2006).
63. W. Zheng *et al.*, Maternal phosphatidylinositol 3-kinase signalling is crucial for embryonic genome activation and preimplantation embryogenesis. *EMBO reports* **11**, 890-895 (2010).
64. A. Veillette *et al.*, Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biology of reproduction* **88**, 79 (2013).
65. F. Fabi *et al.*, Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. *PloS one* **12**, e0177387 (2017).
66. K. Kuida *et al.*, Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94**, 325-337 (1998).
67. T. Sato *et al.*, Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *The Anatomical record* **248**, 76-83 (1997).
68. X.-M. Y. a. Z. Dond, *Essentials of Apoptosis; A guide for Basic and Clinical Research*. (Human Press, 2003).
69. A. Joswig, H. D. Gabriel, M. Kibschull, E. Winterhager, Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **1**, 44 (2003).
70. A. Gross, J. M. McDonnell, S. J. Korsmeyer, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* **13**, 1899-1911 (1999).
71. N. A. Thornberry, Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry & biology* **5**, R97-103 (1998).
72. G. Bragard, Mahillon, Michiels. (Université Catholique de Louvain, Belgique).
73. A. Kelekar, B. S. Chang, J. E. Harlan, S. W. Fesik, C. B. Thompson, Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Molecular and cellular biology* **17**, 7040-7046 (1997).
74. J. Hayakawa *et al.*, Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer research* **60**, 5988-5994 (2000).

75. G. M. Cohen, Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal* **326 (Pt 1)**, 1-16 (1997).
76. A. Agarwal *et al.*, Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **7**, 143 (2009).
77. M. D. D.Driak, I. Svandova, B. Sehnal, K. Benkova, Z. Spukova, M. Halaska, Changes in Expression of Some Apoptotic Markers in Different Types of Human Endometrium *Folia Biologica*, (2011).
78. G. de Murcia, J. Menissier de Murcia, Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends in biochemical sciences* **19**, 172-176 (1994).
79. D. D'Amours, M. Germain, K. Orth, V. M. Dixit, G. G. Poirier, Proteolysis of poly (ADP-ribose) polymerase by caspase 3: kinetics of cleavage of mono (ADP-ribosyl)ated and DNA-bound substrates. *Radiation research* **150**, 3-10 (1998).
80. A. Joshi *et al.*, PARP1 during embryo implantation and its upregulation by oestradiol in mice. *Reproduction* **147**, 765-780 (2014).
81. R. C. Burghardt *et al.*, Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells, tissues, organs* **172**, 202-217 (2002).
82. Y. M. Vasquez *et al.*, FOXO1 is required for binding of PR on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization. *Mol Endocrinol* **29**, 421-433 (2015).
83. H. Huang, D. J. Tindall, Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of cell science* **120**, 2479-2487 (2007).
84. A. Brunet *et al.*, Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868 (1999).
85. G. Tzivion, M. Dobson, G. Ramakrishnan, FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 1938-1945 (2011).
86. Y. Q. Xing *et al.*, The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life sciences* **193**, 124-131 (2018).

87. T. Hosaka *et al.*, Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2975-2980 (2004).
88. Y. M. Vasquez *et al.*, FOXO1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation. *PLoS genetics* **14**, e1007787 (2018).
89. S. Labied *et al.*, Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Mol Endocrinol* **20**, 35-44 (2006).
90. W. Fan *et al.*, FOXO1 expression and regulation in endometrial tissue during the menstrual cycle and in early pregnancy decidua. *Gynecologic and obstetric investigation* **74**, 56-63 (2012).
91. K. P. Nephew *et al.*, Expression of fos and jun proto-oncogenes in benign versus malignant human uterine tissue. *Gynecologic oncology* **76**, 388-396 (2000).
92. S. Yamashita, A. Takayanagi, N. Shimizu, Temporal and cell-type specific expression of c-fos and c-jun protooncogenes in the mouse uterus after estrogen stimulation. *Endocrinology* **137**, 5468-5475 (1996).
93. D. K. Webb, B. C. Moulton, S. A. Khan, Estrogen induced expression of the c-jun proto-oncogene in the immature and mature rat uterus. *Biochemical and biophysical research communications* **168**, 721-726 (1990).
94. D. K. Webb, B. C. Moulton, S. A. Khan, Estrogen induces expression of c-jun and jun-B protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology* **133**, 20-28 (1993).
95. S. Bircan *et al.*, Immunohistochemical analysis of c-myc, c-jun and estrogen receptor in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Pathology oncology research : POR* **11**, 32-39 (2005).
96. R. Wisdom, R. S. Johnson, C. Moore, c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *The EMBO journal* **18**, 188-197 (1999).
97. T. Udou, T. Hachisuga, H. Tsujioka, T. Kawarabayashi, The role of c-jun protein in proliferation and apoptosis of the endometrium throughout the menstrual cycle. *Gynecologic and obstetric investigation* **57**, 121-126 (2004).

98. K. P. Nephew, M. Tang, S. A. Khan, Estrogen differentially affects c-jun expression in uterine tissue compartments. *Endocrinology* **134**, 1827-1834 (1994).
99. Z. L. Li *et al.*, Identification of c-Jun as bcl-2 transcription factor in human uterine endometrium. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* **51**, 1601-1609 (2003).
100. A. Salmi, M. Ammala, E. M. Rutanen, Proto-oncogenes c-jun and c-fos are down-regulated in human endometrium during pregnancy: relationship to oestrogen receptor status. *Molecular human reproduction* **2**, 979-984 (1996).
101. A. Caron, D. Richard, M. Laplante, The Roles of mTOR Complexes in Lipid Metabolism. *Annual review of nutrition* **35**, 321-348 (2015).
102. Y. Wang, L. Zhu, S. Kuokkanen, J. W. Pollard, Activation of protein synthesis in mouse uterine epithelial cells by estradiol-17beta is mediated by a PKC-ERK1/2-mTOR signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E1382-1391 (2015).
103. M. Laplante, D. M. Sabatini, mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293 (2012).
104. S. I. Arriola Apelo, D. W. Lamming, Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **71**, 841-849 (2016).
105. Y. Sancak *et al.*, Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290-303 (2010).
106. M. Laplante, D. M. Sabatini, Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science* **126**, 1713-1719 (2013).
107. Y. Tanaka *et al.*, Deletion of tuberous sclerosis 1 in somatic cells of the murine reproductive tract causes female infertility. *Endocrinology* **153**, 404-416 (2012).
108. Z. Z. Jiang *et al.*, LKB1 acts as a critical gatekeeper of ovarian primordial follicle pool. *Oncotarget* **7**, 5738-5753 (2016).
109. Z. Chen *et al.*, Rictor/mTORC2 pathway in oocytes regulates folliculogenesis, and its inactivation causes premature ovarian failure. *The Journal of biological chemistry* **290**, 6387-6396 (2015).

110. K. N. Choe, G. L. Moldovan, Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork. *Molecular cell* **65**, 380-392 (2017).
111. R. S. Garofalo *et al.*, Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* **112**, 197-208 (2003).
112. S. M. Soyal *et al.*, Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis* **41**, 58-66 (2005).
113. J. D. Graham, C. L. Clarke, Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews* **18**, 502-519 (1997).
114. T. H. P. Altas, The Human Protein Atlas
115. P. L. Caron, G. Frechette-Frigon, C. Shooner, V. Leblanc, E. Asselin, Transforming growth factor beta isoforms regulation of Akt activity and XIAP levels in rat endometrium during estrous cycle, in a model of pseudopregnancy and in cultured decidual cells. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **7**, 80 (2009).
116. A. M. Kelleher *et al.*, Forkhead box a2 (FOXA2) is essential for uterine function and fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E1018-E1026 (2017).
117. T. Kajihara, J. J. Brosens, O. Ishihara, The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Medical molecular morphology* **46**, 61-68 (2013).
118. L. Liu, Y. Wang, Q. Yu, The PI3K/Akt signaling pathway exerts effects on the implantation of mouse embryos by regulating the expression of RhoA. *International journal of molecular medicine* **33**, 1089-1096 (2014).
119. S. Faes, O. Dormond, PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *International journal of molecular sciences* **16**, 21138-21152 (2015).
120. B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu, G. B. Mills, Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **4**, 988-1004 (2005).
121. X. D. Peng *et al.*, Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development* **17**, 1352-1365 (2003).

122. Z. Z. Yang *et al.*, Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 10407-10418 (2005).
123. K. Brasseur, N. Gevry, E. Asselin, Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget* **8**, 4008-4042 (2017).
124. D. S. Inderdeo, D. R. Edwards, V. K. Han, R. Khokha, Temporal and spatial expression of tissue inhibitors of metalloproteinases during the natural ovulatory cycle of the mouse. *Biology of reproduction* **55**, 498-508 (1996).
125. L. Tessitore *et al.*, Adipocyte expression and circulating levels of leptin increase in both gynaecological and breast cancer patients. *International journal of oncology* **24**, 1529-1535 (2004).
126. S. Lalitkumar *et al.*, Polyethylene glycated leukemia inhibitory factor antagonist inhibits human blastocyst implantation and triggers apoptosis by down-regulating embryonic AKT. *Fertility and sterility* **100**, 1160-1169 (2013).
127. D. Gentilini *et al.*, PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Molecular human reproduction* **13**, 317-322 (2007).
128. H. J. Chang *et al.*, Pik3ca is required for mouse uterine gland development and pregnancy. *PloS one* **13**, e0191433 (2018).
129. P. S. Cooke *et al.*, Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6535-6540 (1997).
130. Q. Wang *et al.*, Wnt6 is essential for stromal cell proliferation during decidualization in mice. *Biology of reproduction* **88**, 5 (2013).
131. B. Carlsson, H. Billig, Insulin-like growth factor-I gene expression during development and estrous cycle in the rat uterus. *Molecular and cellular endocrinology* **77**, 175-180 (1991).
132. T. Gamo *et al.*, Effects of tumor necrosis factor-alpha on cell proliferation, prostaglandins and matrix-metalloproteinases production in rat endometrial stromal cells cultured in vitro. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology* **307**, 699-707 (2007).

133. A. Sharma, P. Kumar, Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *Journal of human reproductive sciences* **5**, 2-6 (2012).
134. J. Cheng, G. Rosario, T. V. Cohen, J. Hu, C. L. Stewart, Tissue-Specific Ablation of the LIF Receptor in the Murine Uterine Epithelium Results in Implantation Failure. *Endocrinology* **158**, 1916-1928 (2017).
135. C. A. Gray, R. C. Burghardt, G. A. Johnson, F. W. Bazer, T. E. Spencer, Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* **124**, 289-300 (2002).
136. A. M. Kelleher, G. W. Burns, S. Behura, G. Wu, T. E. Spencer, Uterine glands impact uterine receptivity, luminal fluid homeostasis and blastocyst implantation. *Scientific reports* **6**, 38078 (2016).
137. P. S. Cooke, T. E. Spencer, F. F. Bartol, K. Hayashi, Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Molecular human reproduction* **19**, 547-558 (2013).
138. X. Li *et al.*, LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget* **5**, 788-801 (2014).
139. L. M. Senturk, A. Arici, Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol* **39**, 144-151 (1998).
140. C. L. Stewart *et al.*, Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* **359**, 76-79 (1992).
141. H. Bhatt, L. J. Brunet, C. L. Stewart, Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 11408-11412 (1991).
142. W. Lin, S. Titus, F. Moy, E. S. Ginsburg, K. Oktay, Ovarian Aging in Women With BRCA Germline Mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **102**, 3839-3847 (2017).
143. F. A. Peccatori *et al.*, Fertility preservation in women harboring deleterious BRCA mutations: ready for prime time? *Hum Reprod* **33**, 181-187 (2018).
144. V. Leblanc, M. C. Dery, C. Shooner, E. Asselin, Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17 β -estradiol at estrus. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **1**, 59 (2003).

145. J. K. Riley *et al.*, The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology* **284**, 377-386 (2005).
146. M. Wetendorf, F. J. DeMayo, The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Molecular and cellular endocrinology* **357**, 108-118 (2012).
147. E. Stelmanska, Z. Kmiec, J. Swierczynski, The gender- and fat depot-specific regulation of leptin, resistin and adiponectin genes expression by progesterone in rat. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **132**, 160-167 (2012).
148. S. Caja, M. Puerta, Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **39**, 501-506 (2007).
149. Y. Xu, D. Nan, J. Fan, J. S. Bogan, D. Toomre, Optogenetic activation reveals distinct roles of PIP3 and Akt in adipocyte insulin action. *Journal of cell science* **129**, 2085-2095 (2016).
150. A. D. Kohn, S. A. Summers, M. J. Birnbaum, R. A. Roth, Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of biological chemistry* **271**, 31372-31378 (1996).
151. Y. Ng, G. Ramm, J. A. Lopez, D. E. James, Rapid activation of Akt2 is sufficient to stimulate GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Cell metabolism* **7**, 348-356 (2008).
152. E. Gonzalez, T. E. McGraw, Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 7004-7009 (2009).
153. B. Mulac-Jericevic, J. P. Lydon, F. J. DeMayo, O. M. Conneely, Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9744-9749 (2003).
154. B. Mulac-Jericevic, R. A. Mullinax, F. J. DeMayo, J. P. Lydon, O. M. Conneely, Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* **289**, 1751-1754 (2000).
155. L. C. Kao *et al.*, Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* **143**, 2119-2138 (2002).

156. H. Oner, J. Oner, R. Demir, Distributions of PCNA and Cas-3 in rat uterus during early pregnancy. *Folia histochemica et cytobiologica* **48**, 71-77 (2010).
157. M. C. Dery, V. Leblanc, C. Shooner, E. Asselin, Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **1**, 47 (2003).
158. C. A. Mendoza-Rodriguez, M. G. Monroy-Mendoza, S. Morimoto, M. A. Cerbon, Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation. *Molecular and cellular endocrinology* **208**, 31-39 (2003).
159. E. Asselin, G. B. Mills, B. K. Tsang, XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer research* **61**, 1862-1868 (2001).
160. E. Asselin, Y. Wang, B. K. Tsang, X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development. *Endocrinology* **142**, 2451-2457 (2001).
161. C. Tessier, A. Prigent-Tessier, S. Ferguson-Gottschall, Y. Gu, G. Gibori, PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* **142**, 4086-4094 (2001).
162. S. Y. Foo, G. P. Nolan, NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends in genetics: TIG* **15**, 229-235 (1999).
163. C. Stehlik *et al.*, Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *The Journal of experimental medicine* **188**, 211-216 (1998).
164. C. W. Xiao, K. Ash, B. K. Tsang, Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Endocrinology* **142**, 557-563 (2001).
165. Y. Wang *et al.*, Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **286**, H685-692 (2004).
166. X. Yue, L. Wu, W. Hu, The regulation of leukemia inhibitory factor. *Cancer cell & microenvironment* **2**, (2015).

167. F. Tepekoy, G. Akkoyunlu, R. Demir, The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *Journal of assisted reproduction and genetics* **32**, 337-346 (2015).
168. M. Mericskay, J. Kitajewski, D. Sassoon, Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development* **131**, 2061-2072 (2004).
169. C. Miller, D. A. Sassoon, Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development* **125**, 3201-3211 (1998).
170. S. Sonderegger *et al.*, Wntless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation. *Endocrinology* **151**, 211-220 (2010).
171. B. Cheatham *et al.*, Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Molecular and cellular biology* **14**, 4902-4911 (1994).